

PROTOPLASMA

IN VERBINDUNG MIT R. CHAMBERS UND W. SEIFRIZ
BEGRÜNDET VON FRIEDL WEBER UND JOSEF SPEK

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET
BRUXELLES

N. KAMIYA
OSAKA

H. KINZEL
WIEN

A. PISCHINGER
WIEN

P. SITTE
HEIDELBERG

S. STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

K. HÖFLER
WIEN

E. PERNER
HANNOVER

K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN
BONN

BAND LIV, HEFT 2
MIT 68 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 14. AUGUST 1961



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1961

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 700 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, Kurze Mitteilungen, kritische Übersichtsartikel, Sammelreferate und Referate aus allen Gebieten der Protoplasmaforschung. Beiträge können in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle mit der Redaktion zusammenhängenden Fragen sind zu richten an:

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Wien, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich, oder

Prof. Dr. E. Perner, Botanisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover-Kirchrode, Banteweg 17, Westfalenhof, Deutschland, oder

Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität Bonn, Bonn, Poppelsdorfer Schloß, Deutschland.

Geschäftliche Mitteilungen, besonders alle Korrespondenz, die Sonderdrucke betrifft, sind an den

Springer-Verlag

Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie-Telegraphadresse: Springerbuch Wien

zu richten.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif einzusenden, so daß bei der Korrektur nur noch Druckfehler verbessert zu werden brauchen. Nachträgliche Änderungen, die 10% der Satzkosten überstiegen, müssen dem Autor in Rechnung gestellt werden.

Der Satz soll kurz gefaßt sein. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (= 24 Druckseiten) nicht überschreiten. Bei längeren Arbeiten ist in der Sprache der Originalarbeit eine Zusammenfassung, die kurz zu halten ist, beizufügen. Es wird dem Autor freigestellt, zusätzlich eine kurze englische bzw. deutsche Zusammenfassung zu liefern. Literaturzitate sind, nach Autorennamen alphabetisch geordnet, am Schluß der Arbeit zu bringen.

Die Abbildungsvorlagen sind dem Manuskript auf gesonderten Blättern beizulegen. Sie müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Beschriftung der Abbildungen erfolgt durch den Verlag. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors gebracht werden.

Die Autoren erhalten 100 Sonderdrucke ihrer Arbeit kostenlos als Entgelt und können weitere Sonderdrucke zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit einem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel erfolgen. Für Sammelreferate wird außerdem ein Unkostenersatz geleistet.

Es wird empfohlen, ausführlichere Richtlinien über die Beschaffenheit der Manuskripte und Abbildungsvorlagen bei den Herausgebern oder beim Verlag, die sie gerne zur Verfügung stellen, anzufordern.

Es werden nur unveröffentlichte Arbeiten aufgenommen; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u.ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Der Verlag

LIV. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft

Kinzel, H., und Erika Bolay: Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen	177
Höfler, K.: Osmotisch bedingte polare Verlagerungen im Protoplasten von <i>Cladophora prolifera</i>	200
Diskus, A.: Über den Bau des Vakuolensystems einiger <i>Cladophora</i> -Arten.	217
Thaler, Irmtraud: Eiweißkörper in <i>Neomonospora furcellata</i>	223
Weissenfels, N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmeyoblasten. (I. Die Transformation der Mitochondrien)	229
Jonek, J. J.: Über das Verhalten der Phosphatasen und Lipasen in den Nebennieren von Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie.	241
Stadelmann, E.: Zur Wirkung von α -Strahlen auf Plasma und Zellorganellen von <i>Allium-cepa</i> -Epidermen	247
Strugger, S., und Elisabeth Peveling: Über den Feinbau der Chromatophoren von <i>Cladophora fracta</i> Kütz	254
Biebl, R., W. Url und Gertrude Janeček: Untersuchungen über Strahlenschutz an Pflanzenzellen. (II. Schutzwirkung verschiedener schwefelhaltiger Verbindungen gegen kurzwellige UV-Strahlen).	263

Kurze Mitteilungen

Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien IX. Die elektronenmikroskopische Feinstruktur des Grundcytoplasmas nach „wasserlöslicher Einbettung“	307
Schnepf, E.: Plastidenstrukturen bei <i>Passiflora</i>	310

Referate	314
--------------------	-----

Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen

Von

Helmut Kinzel und Erika Bolay

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Januar 1961)

Einleitung

In den Untersuchungen über Vitalfärbung von pflanzlichen Zellsäften werden seit Höfler (1947) die sogenannten „leeren“ Zellsäfte, die basische Farbstoffe nur auf Grund ihrer Acidität als Ionen speichern, von den „vollen“ Zellsäften unterschieden, die bestimmte Speicherstoffe besitzen, welche sich mit basischen Farbstoffen mehr oder weniger fest chemisch verbinden können. Der Ausdruck „Speicherstoffe“ darf nicht dahin mißverstanden werden, als seien damit die Reservestoffe der betreffenden Zellen gemeint, sondern es handelt sich um Substanzen, die sich im Vitalfärbversuch dadurch zu erkennen geben, daß sie den eindringenden basischen Farbstoff chemisch binden und so zu seiner Speicherung führen. Die chemische Natur dieser Substanzen war zunächst noch nicht bekannt. Nachdem Härtel (1951) und Kinzel (1958) die ersten Anhaltspunkte zur Lösung dieses Problems geliefert hatten, klärte Bolay (1960) in eingehenden histochemischen Untersuchungen dasselbe weitgehend auf: Die für die „volle“ Natur eines Zellsaftes verantwortlichen Stoffe gehören sämtlich in die Flavon-Gerbstoff-Gruppe.

Über diese allgemeine Feststellung hinaus konnte die genannte Verfasserin auf Grund des Färbebildes noch nähere Angaben über die in einer bestimmten Zelle vorhandenen Inhaltsstoffe machen. Es ist ja bekannt, daß bei vollen¹ Zellsäften die Farbstoffspeicherung sehr oft nicht diffus erfolgt, sondern in Form von Entmischungstropfen, Krümeln oder Kristallen. Schon

¹ Der Terminus „volle Zellsäfte“ ist hier in einem erweiterten Sinne gebraucht. Höfler (1947) verstand darunter zunächst nur die mit Akridinorange grün fluoreszierenden Zellsäfte (vgl. dazu Höfler und Schindler 1955, S. 174).

der erste Vitalfärber, Pfeffer (1886), hat die meisten dieser Formen gesehen. Cholnoky und Höfler (1950, S. 174) geben eine schöne Übersicht über die bis dahin bekannten Erscheinungen. Danach kann eine Farbstoffspeicherung in vollen Zellsäften erfolgen „1. durch Bildung unlöslicher, fester Niederschläge, z. B. Krümelbildung in gerbstoffhaltigen Vakuolen, 2. unter Bildung gefärbter Tröpfchen, die anfangs BMB zeigen und oft durch Berührung zu größeren Kugeln, den sogenannten Entmischungskugeln, zusammenfließen, 3. unter kristallinischer Ausfällung, 4. durch Löslichkeitsspeicherung, wobei die gefärbten Reaktionsprodukte gelöst und diffus im Vakuum verteilt bleiben.“ (Vergleiche dazu auch die zusammenfassenden Darstellungen von Strugger 1949 und Drawert 1956.)

Bolay (1960) hat nun so vielfältige Erscheinungen beobachtet, daß eine weitere Differenzierung der Terminologie notwendig wurde. Es werden danach solche Entmischungen, die ihren flüssigen Charakter längere Zeit hindurch beibehalten und daher, wenn sie in einer Zelle in der Mehrzahl entstehen, zu großen Kugeln zusammenfließen können, wie bisher Entmischungskugeln genannt (vgl. Abb. 3, S. 186). Bleibt infolge von allmählicher Verfestigung das Zusammenfließen auf halbem Wege stehen, dann werden die entstehenden unregelmäßigen Gebilde „Verschmelzungsprodukte“ genannt (vgl. Abb. 4). In anderen Fällen werden die zunächst ebenfalls in Tröpfchenform auftretenden Entmischungen ziemlich schnell fest und können dann nicht zusammenfließen, sondern nur untereinander verkleben. Es entstehen „Dendriten“ (Abb. 5). Schließlich können auch feinflockige Fällungen, sogenannte „Krümel“ (Abb. 7), entstehen, die sich nur bei starker Vergrößerung als aus winzigen isodiametrischen Partikelchen zusammengesetzt erweisen.

Es zeigte sich nun bei den Untersuchungen von Bolay (1960), daß diejenigen Zellsäfte, die nach den histochemischen Reaktionen flavonhaltig und gerbstofffrei waren, bei Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen vor allem Entmischungskugeln oder Kristalle zeigten, während die gerbstoffhaltigen Zellsäfte mehr zur Bildung von Dendriten oder Krümelneigten. Die darauf aufgebaute Unterscheidungsmöglichkeit hatte jedoch einen Schönheitsfehler: sowohl unter den gerbstofffreien als auch unter den gerbstoffhaltigen Zellsäften gibt es solche, die die Farbstoffe auch nach langen Färbezeiten nur diffus speichern und keine Neigung zur Bildung von Entmischungen oder Fällungen zeigen. Unter den gerbstofffreien Objekten zeigten viele dieses Verhalten, unter den gerbstoffhaltigen jedoch nur eine kleine markante Gruppe, nämlich die Gerbstoff-Idioblasten (Abb. 1), die sich in der Epidermis oder im Mesophyll von verschiedenen *Sedum*-Arten, von *Anagallis* und einigen anderen Pflanzen vorfinden (vgl. Zöttl 1960 und Bolay 1960, Tabelle 6). Diese Zellsäfte geben im histochemischen Versuch besonders kräftige Gerbstoffreaktion, im Vitalfärbversuch aber nur intensive Diffusfärbung.

Schon auf Grund der in der genannten Arbeit beschriebenen Versuche war indessen zu vermuten, daß diese Diffusfärbung ihrem Wesen nach etwas anderes ist als die Diffusfärbung der flavonhaltigen Zellsäfte: Nach Einwirkung von Acridinorange fluoreszieren die Gerbstoffidioblasten oft

nicht grün, wie dies für die vollen Zellsäfte die Regel ist, sondern in einem stumpfen bräunlich-rötlichen Ton. Da nun die in anderen Zellsäften mit Acridinorange auftretenden Entmischungsformen ebenfalls rot fluoreszieren, so lag folgende Annahme nahe: die diffuse Anfärbung der Gerbstoffidioblasten beruht nicht darauf, daß mit den betreffenden Inhaltsstoffen keine Farbstoff-fällung möglich ist, sondern im Gegenteil auf einer so raschen Ausfällung, daß der entstehende Niederschlag im submikroskopisch-kolloidalen Bereich bleibt. Das Kolloidal bleiben oder das nachträgliche Kolloidal werden von Fällungen tritt ja besonders bei sehr schwerlöslichen Verbindungen, wie etwa Schwermetallsulfiden oder AgCl , häufig auf, wie jeder weiß, der sich schon mit analytischer Chemie beschäftigt hat.

Es bestand in dieser Situation das Bedürfnis, weitere Versuche durchzuführen mit dem Ziel, die vorgetragene Hypothese zu stärken oder zu entkräften. Als ein brauchbarer Weg dazu erwies sich das Studium der Veränderungen, welche die Entmischungsformen erfahren, wenn der pH-Wert des Zellsaftes verändert wird. Letzteres ist zum Beispiel leicht durch Einwirkung von Ammoniak zu erreichen. Über die Ergebnisse dieser Versuche, die von der zweitgenannten Verfasserin durchgeführt wurden, wird im folgenden berichtet.

Material und Methodik

Als Objekte für die im folgenden angegebenen Untersuchungen dienten im wesentlichen die gleichen Freilandpflanzen, die schon früher tabellarisch erfaßt und auf ihre „Speicherstoffe“ hin untersucht worden waren (Bölay 1960). Es handelte sich dabei also um Pflanzen aus den Gebieten eoanärer Sandsteine des Wienerwaldes, aus den alluvialen Aufschüttungen der Donauauen sowie um Pflanzen der Hainburger Berge (Jurakalke, kristalline Schiefer) und der Gänserndorfer Heide (diluviale Schotter). Einige der Objekte stammten aus dem botanischen Garten der Universität Wien. Die zu den Versuchen verwendeten Gewebeschnitte wurden nochmals genaue-

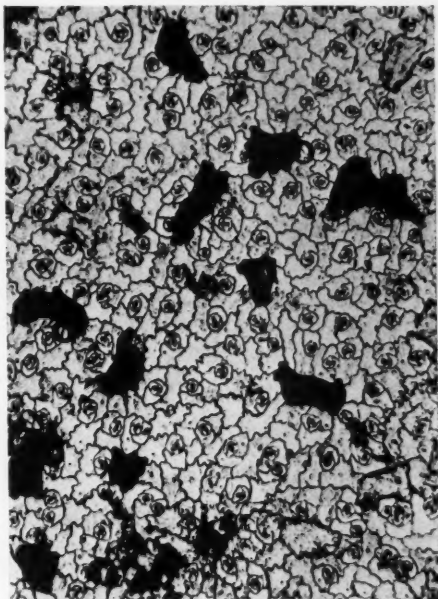


Abb. 1. *Sedum maximum*, Blatt, Oberepidermis. Gerbstoff-Idioblasten elektiv angefärbt. (Aus Zöttl 1960.)

stens auf ihre Speicherstoffe hin geprüft, da ja die Menge eines Inhaltsstoffes, vielleicht aber auch sein Vorhandensein überhaupt, wohl zum Teil standortsbedingt ist und daneben wahrscheinlich noch vom Entwicklungszustand der Pflanze sowie von der Jahreszeit beeinflusst wird.

In der Regel wurden die in phosphatgepufferten Farblösungen gefärbten Schnitte (meist Blatt-Oberepidermen) nachträglich der Wirkung von NH_3 ausgesetzt. Diese Base durchdringt — wie seit de Vries 1871 bekannt — leicht das lebende Protoplasma und verändert den pH-Wert des Zellsaftes. Die Behandlung mit NH_3 geschah in verschiedener Weise: entweder wurden die Schnitte auf einem Objektträger den Dämpfen einer konzentrierten Ammoniaklösung ausgesetzt oder eine $n/100$ Ammoniaklösung wurde durch das Präparat gesaugt. Gelegentlich wurde auch mit NH_3 -haltigen Farblösungen gefärbt.

An Farbstoffen wurden verwendet: die basischen Farbstoffe Neutralrot, Brillanteresylblau, Toluidinblau und Acridinorange sowie der gleichfalls basische, aber im physiologischen pH-Bereich undissoziierte Farbstoff Rodamin B. Die in einer Konzentration 1 : 1000 hergestellten Stammlösungen wurden — je nach dem Versuchsziel — mit Leitungswasser, mit destilliertem Wasser und Phosphatpufferlösung oder mit $n/100$ bzw. $n/200$ NH_3 auf eine Konzentration von 1 : 10.000 verdünnt. In diesen Farblösungen verblieben die Schnitte bis zu 4 Stunden, im Dauerversuch bis zu 24 Stunden.

Die Mikrophotographien wurden zumeist von Doz. Dr. W. Url hergestellt, dem hierfür herzlich gedankt sei.

V Versuchsergebnisse

A. Entmischungsversuche mit Ammoniak an gerbstofffreien Pflanzen

Um kurz zu zeigen, in welcher Weise die Versuche durchgeführt wurden, seien einige Protokolle wiedergegeben. Zunächst sind einige Fälle von Bedeutung, bei denen es zur Entmischung von Diffusfärbungen kam, wenn man die bereits gefärbten Schnitte auf dem Objektträger wenige Sekunden lang den Ammoniakdämpfen aussetzte.

1. Von *Muscari comosum* wurden Schnitte der Blattoberseite zur Untersuchung verwendet. Auf Grund der Gerbstoffreaktionen mit Coffein, Eisenchlorid und anderen Gerbstoffreagenzien und deren negativem Verlauf war ein Gerbstoffgehalt der Zellen auszuschließen. Dagegen verlief die Reaktion auf Flavonderivate mit Ammoniak nach Molisch (1923) unter lebhafter Gelbfärbung, also positiv. Die Zellen der Blattoberepidermis wurden nun folgenden Färbungen unterworfen:

a) Mit Neutralrot erhält man nach eineinhalb Stunden Färbedauer nur Diffusfärbung in allen Epidermiszellen. Läßt man Ammoniak ganz kurz auf das Präparat einwirken, indem man den Objektträger über eine Ammoniakflasche hält, so fallen in den Zellen sehr viele kleine Kügelchen aus, die dann zu größeren und endlich zu recht schönen, großen Entmischungskugeln zusammenfließen. Läßt man die Ammoniakdämpfe nur einige Sekunden länger einwirken, so setzt eine Kristallisation von den

Kugeln aus ein. Dies konnte man öfter auch bei anderen Objekten beobachten, so bei *Anthyllis vulneraria*, *Colchicum autumnale* und *Platanthera bifolia*. Durch den in die Vakuolen eindringenden Ammoniak wird die Reaktion in vorher sauren Zellsäften nach der alkalischen Seite verschoben. Es war nun interessant, zu versuchen, was geschehen würde, wenn man einem durch Ammoniak zur Kugelbildung angeregten Objekt eine saure Pufferlösung zusetzte. Dadurch muß ja der Ammoniak zu rascher Abdiffusion aus den Zellen gezwungen werden. Es wurde ein Puffer pH 2,0 durch das Präparat gesaugt. Darauf zeigte sich, daß die Kugeln verschwinden und die Zellen nur diffus gefärbt erscheinen. Bei erneuter Einwirkung von Ammoniakdämpfen kann man wieder ein Ausfallen von Kügelchen erreichen, die sich zu größeren und großen Kugeln vereinigen. Setzt man nochmals saure Pufferlösung zu, so lösen sich die Kugeln zu Diffusfärbung auf usw.

b) Auch mit Brillantcresylblau erzielt man nach zweistündiger Behandlung nur Diffusfärbung. Bei kurzer Einwirkung von Ammoniakdämpfen schlägt diese von Blaugrün nach Grün um und es beginnen kleine Kügelchen auszufallen, die zu größeren zusammenfließen. Diese großen Kugeln sind dann, wie alle Entmischungskugeln, viel dunkler gefärbt als der sie umgebende Zellsaft, der einen diffusen Schimmer aber nicht ganz verliert. Mit einer sauren Pufferlösung kann man ein Verschwinden der Kugeln und erneutes Auftreten der kräftigen Diffusfärbung bewirken.

c) Mit Toluidinblau sind ebenfalls nach zwei Stunden die Vakuolen nur diffus gefärbt. Durch NH_3 wird wieder kugelige Entmischung hervorgerufen. Ein Auskristallisieren des Farbstoffes wie bei Neutralrot erfolgte hier selbst bei 15 Minuten wärendender Behandlung mit Ammoniakdämpfen nicht.

d) Mit Acridinorange sind nach zweieinhalb Stunden Färbezeit in einigen randnahen Zellen fluoreszenzmikroskopisch schon dunkelrote Kugeln zu sehen, im wesentlichen aber fluoreszieren die Zellen gelbgrün, zum Rande hin olivgrün mit rötlichem Stich. Läßt man Ammoniakdämpfe auf den Schnitt einwirken, so verschwindet die gelbgrüne Fluoreszenz, es fallen im Hellfeld dunkelgelbe, im UV dunkelbraunrote Kugeln aus. In den Zellen der Schnittmitte entstehen zunächst keine Kugeln, sondern seltsam verzweigte Verschmelzungsprodukte, die sich aber im Laufe der Zeit ebenfalls zu Kugeln abrunden. Die Fluoreszenz ist außerhalb der Entmischungen nur mehr ganz schwach dunkelgrün. Saugt man Puffer pH 2,0 durch das Präparat, so verschwinden die Kugeln und es tritt wieder schöne gelbgrüne, am Rand olivrötliche Fluoreszenz auf.

Es muß erwähnt werden, daß zur Auslösung dieses Effektes nicht unbedingt eine so stark saure Pufferlösung nötig ist. Eine Lösung vom pH 4,8 führt zum gleichen Ergebnis, wenn auch erst nach längerer Zeit. Es gibt sogar Objekte, bei denen ein einfaches Übertragen des Schnittes in dest. Wasser genügt, wie z. B. *Phyteuma orbiculare*. Hier ergibt die durch Acridinorange pH 11,2 entstandene Diffusfärbung mit Ammoniak kleinste rote Kügelchen, die sich nach Übertragen des Schnittes in dest. Wasser auflösen und bei neuerlicher Ammoniakbehandlung wieder ausfallen.

Der im physiologischen pH-Bereich undissoziierte Farbstoff Rodamin B verhält sich abweichend (siehe später unter 3).

2. *Phyteuma spicatum* schien uns deshalb erwähnenswert, weil bei diesem ebenfalls ganz gerbstofffreien Objekt durch Ammoniakdämpfe nicht nur eine kugelige, sondern auch eine dendritenartige Entmischung zu erzielen war.

a) Mit Neutralrot entstehen in manchen Zellen der Blattoberepidermis aus der Diffusfärbung durch NH_3 nur Kugeln, in anderen Dendriten. Daneben gibt es noch Zellen, die sowohl eine größere Kugel oder deren mehrere als auch reich verzweigte Dendriten enthalten.

b) Bei Brillantcresylblau bilden sich unter Ammoniakewirkung zierliche Dendriten, die sich bei Zusatz einer Spur saurer Pufferlösung zu Kugeln zusammenziehen. Diese lösen sich nach Zusatz weiterer Pufferlösung in der bekannten Weise zu Diffusfärbung auf.

c) Toluidinblau verhält sich ganz wie Brillantcresylblau.

d) Acridinorange jedoch bildet schon nach dreieinhalb Stunden im Farbbad am Schnitttrand große, im UV rot leuchtende Kugeln aus.

e) Mit Rhodamin B kann man auch bei diesem Objekt durch Ammoniak die Diffusfärbung nicht entmischen (siehe weiter unten!)

Auch bei *Phyteuma orbiculare* läßt sich die Diffusfärbung mit Neutralrot nach 1½ Std. leicht zu großen Kugeln entmischen, vor allem in den schnittrandnahen Zellen. Auch in den mit Toluidinblau diffus gefärbten Vakuolen entstehen schöne Entmischungstropfen. Dagegen tritt in durch Brillantcresylblau pH 8,3 gefärbten Zellsäften bei Behandlung mit Ammoniakdämpfen eine Fällung aus winzigsten Partikelchen auf, die sich in lebhafter BMB befinden, aneinander kleben bleiben und so eine deutliche Krümfällung ausbilden. Bei Zusatz von etwas dest. Wasser zieht sich diese Krümfällung jedoch relativ rasch zu großen Kugeln zusammen.

Sehr schön konnte man das Zusammenziehen von Krümfällungen über das Zwischenstadium zierlicher Dendriten bei Schnitten der Blattoberseite von *Platanthera bifolia* beobachten. Es wurde dazu einmal ein anderer Weg beschritten als bei den bereits erwähnten Versuchen. Der wie üblich durch Entlüften vorbereitete Schnitt wurde sofort, ohne Färbung, auf einem Objektträger den Ammoniakdämpfen ausgesetzt. Dabei trat die für Flavonderivate charakteristische Gelbfärbung auf. Anschließend wurde der Schnitt in Wasser ausgewaschen, doch nicht so stark, daß er die Gelbfärbung gänzlich verloren hätte. Der also immer noch leicht gelbe Schnitt kam in einem Tropfen Neutralrotlösung auf dem Objektträger unter das Mikroskop und wurde sofort untersucht. Das erste sichtbare Färbungsergebnis waren ganz rasch auftretende winzigste Kügelchen. Sie wurden schnell etwas größer, zitterten heftig in BMB und bildeten durch Verkleben eine feine Krümfällung. Diese vergrößerte sich bald zu Dendriten. Nach 10 Minuten war die Krümfällung gänzlich verschwunden. In den Zellen lagen einfache (nicht reich verzweigte) Dendriten, die sich innerhalb der nächsten 5 Minuten zu Kugeln abrundeten. Neben dieser Abrundung erfolgte nun auch gleichzeitig eine schwach diffuse Anfärbung.

Eine beschleunigte Abkuglung der Krümel fällung kann man durch Zusatz von ein wenig saurer Pufferlösung pH 2,0 erreichen. Sie verläuft auch hier über die Dendritenform. An diesen Dendriten differenzieren sich nach kurzer Zeit kleinere und größere Kugeln heraus, die durch feine Fäden verbunden sind. Nach dem plötzlichen Zerreißen dieser Fäden, die in die Kugeln hineinfließen, ist die Abrundung innerhalb weniger Sekunden beendet.

Bringt man Schnitte von der *Platanthera*-Oberepidermis ohne Vorbehandlung mit NH_3 in Neutralrot, so kann man schon nach zwei Minuten das Auftreten einer Diffusfärbung feststellen. Auch wenn man den Schnitt eine halbe Stunde in der Farblösung beläßt, ist nirgends die Entstehung eines Entmischungstropfens oder der im Parallelversuch zuerst erschienenen Krümel fällung zu bemerken.

Die Erscheinung, daß eine Diffusfärbung sich durch Ammoniakdämpfe entmischen läßt, konnte außer bei den schon genannten Objekten noch bei folgenden Pflanzen beobachtet werden: *Allium montanum*, *Atropa Belladonna*, *Berberis vulgaris*, *Bryonia dioica*, *Campanula persicifolia*, *Carlina vulgaris*, *Daphne laureola* und *D. mezereum*, *Globularia vulgaris*, *Lycium halimifolium*, *Orchis latifolia*, *Polygonatum officinale*, *Primula veris*, *Scrophularia nodosa*, *Teucrium montanum*, *Veratrum album*, *Viburnum lantana*.

Es muß erwähnt werden, daß nicht alle Farbstoffe die gleiche Bereitschaft zu der erwähnten Reaktion zeigen. Stets läßt sich die Diffusfärbung mit Neutralrot am leichtesten durch NH_3 entmischen, bei Brillantcresylblau und Toluidinblau gelingt dies nicht immer. Rhodamin B verhält sich, wie erwähnt, noch stärker abweichend.

Von Einfluß ist ferner die Färbezeit bzw. die erreichte Konzentration an Farbstoff in der Vakuole. So läßt sich z. B. in den Blattepidermen von *Allium montanum* die Zellsaftfärbung mit Neutralrot, Brillantcresylblau, Toluidinblau und Acridinorange nach 1 bis 4 Stunden Färbezeit nicht mit Ammoniak entmischen, wohl aber nach 24 Stunden (Neutralrot gibt hierbei Kugeln, die anderen Farbstoffe Krümel). Übereinstimmend damit neigen



Abb. 2. *Polygala maior*, Blatt, Oberepidermis. Färbung mit Brillantcresylblau 1 : 10.000, pH 8,3. In den Wundrandzellen treten Kristalle einer Farbstoffverbindung auf, die anderen Zellen zeigen diffuse Farbspeicherung. (Aus B o l a y 1960.)

auch die Wundrandzellen, die ja stets eine größere Farbstoffmenge aufnehmen als die weiter innen gelegenen Zellen, besonders zu Entmischungsercheinungen, sowohl spontan als auch gegebenenfalls nach NH_3 -Einwirkung (vgl. dazu auch Gicklhorn 1929, Elsner 1932 und Höfler 1948 sowie die Abb. 2).

3. Das Verhalten von Rhodamin B. Der Farbstoff neigt mehr als alle anderen untersuchten Farbstoffe zur spontanen Bildung von tropfigen Entmischungen im Zellsaft. Bekannt ist das Verhalten der Außenepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa*, deren Vakuolen (nach kurzer Färbzeit) mit den meisten Farbstoffen Diffusfärbung ergeben, während Rhodamin B in ihnen Entmischungskugeln erzeugt (Drawert 1939 und Abb. 3 der vorliegenden Arbeit).

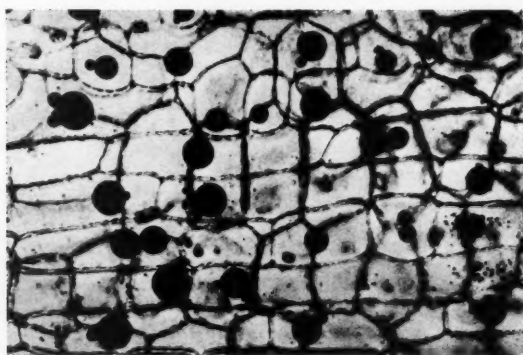


Abb. 3. *Allium cepa*, untere (äußere) Epidermis der Zwiebelschuppe. Entmischungskugeln nach Färbung mit Rhodamin B.

Um so erstaunlicher ist es, daß Ammoniak hier nicht eine Verstärkung der Entmischungstendenz bewirkt, sondern das Gegenteil: die spontan gebildeten Entmischungstropfen lösen sich nach Zusatz von Ammoniak mehr oder weniger schnell zu gelbroter Diffusfärbung auf. Dies wurde beobachtet bei den Blatt-Epidermiszellen von *Campanula patula*, *Daphne genkium*, *Muscari comosum*, *Silene nutans*, *Teucrium montanum*, *Veratrum album* und *Veronica officinalis*.

Auch Dendriten (*Orchis latifolia*), Krümel (*Lycium halimifolium*) und Kristalle (*Polygonatum officinale*), die bei Speicherung von Rhodamin B spontan entstehen, lösen sich leicht bei Einwirkung von Ammoniak.

Durch nachträglichen Zusatz von saurer Pufferlösung läßt sich der Effekt in der Regel nicht rückgängig machen. Nur ganz selten (so bei *Lycium*) war auf diese Weise die Entmischung wieder hervorzurufen.

Zellsäfte, die Rhodamin B von vornherein nur diffus speicherten, ließen sich durch Ammoniak in keinem Falle entmischen.

4. Die Wirkung von Coffein auf gefärbte volle Zellsäfte. Flasch (1955) beobachtete, daß die bei Vitalfärbung mit Rhoda-

min B oder mit Acridinorange auftretenden Entmischungstropfen bei einem Zusatz von Coffein sich auflösen.

Diese Angabe wurde in der vorliegenden Untersuchung auch für andere Farbstoffe bestätigt. Bei der Blattepidermis von *Lycium halimifolium* entstehen nach Vitalfärbung mit Neutralrot Entmischungskugeln, die sich nach Durchsaugen einer 1%igen Coffeinelösung relativ schnell auflösen. Interessanterweise ist dann keine Entmischung durch Ammoniak mehr möglich. Darin unterscheidet sich also die Auflösung der Entmischungskugeln durch Coffein von derjenigen durch saure Pufferlösung, die bereits früher beschrieben worden war. Während die letztere reversibel verläuft, d. h. durch erneute Einwirkung von Ammoniak rückgängig gemacht werden kann, ist im ersten Fall mit Ammoniak selbst nach längerer Zeit ein neuerliches Ausfallen der Kugeln nicht zu erreichen.

Da Coffein also Entmischungskugeln auflöst, die dann durch NH_3 nicht mehr zu fällen sind, sollte es auch eine Entmischung von vornherein verhindern. Daß dem tatsächlich so ist, kann man leicht nachweisen, wenn man einen Schnitt der Blattoberseite von *Daphne mezereum* 2 Stunden in Neutralrot färbt, dann einige Zeit in 1%ige Coffeinelösung überträgt und endlich in eine $n/100$ Ammoniaklösung bringt. Erwartungsgemäß kann man nirgends ein Anzeichen von Entmischung sehen. Erst nach langer Zeit bilden sich in einigen randnahen Zellen Kugeln, wohl infolge Diffusion des Coffeins aus den Vakuolen in das umgebende Medium. Ein parallel mit Neutralrot gefärbter, dann aber nicht in Coffein eingelegter, sondern gleich mit $n/100$ NH_3 behandelter Schnitt zeigt augenblicklich die Fällung vieler kleiner Kugeln, die zu sehr großen Tropfen zusammenfließen.

Auch die mit den anderen Farbstoffen gefärbten Zellsäfte setzen nach einem Coffeinbad der Entmischung durch Ammoniak erheblichen Widerstand entgegen. Mit Toluidinblau kann man nach viereinhalb Stunden Diffusfärbung beobachten, die sich mit $n/100$ Ammoniak in randnahen Zellen zu schönen Kugeln entmischen läßt. Bringt man einen anderen Schnitt dagegen zuerst in Coffein, so erhält man nachher selbst mit konzentriertem Ammoniakdampf keine Entmischung. Ähnliche Resultate liefern die Versuche mit Brillanteresylblau, doch treten hier feine Partikel in den Vakuolen auf, wenn man den Dampf konzentrierten Ammoniaks nicht nur wenige Sekunden, sondern etwas länger auf das Präparat einwirken läßt. Auch die in Acridinorange pH 11,2 gefärbten Zellen entmischen sich nach Zusatz von Coffein nur äußerst zögernd, nach langem Liegen in $n/100$ NH_3 .

Weitere Beispiele für die Verhinderung oder zum mindesten starke Behinderung der NH_3 -Entmischung durch Coffein sind etwa *Platanthera bifolia*, *Lycium halimifolium*, *Teucrium montanum* und *Atropa Belladonna*.

B. Das Färben gerbstofffreier Objekte in ammoniakhaltigen Farblösungen

Zur weiteren Abrundung dieser Entmischungsversuche mit Ammoniak wurde auch noch an einigen Objekten ihr Verhalten gegen NH_3 -haltige Farbstofflösungen geprüft. Die Farblösungen hatten ebenfalls eine Konzentration von 1:10.000, doch war beim Verdünnen der Stammlösung

(1 : 1000) statt dest. Wasser $n/200$ bzw. in manchen Fällen $n/100$ Ammoniak verwendet worden.

1. *Campanula persicifolia* (Blatt, Oberseite) ist eindeutig gerbstofffrei, aber flavonhaltig und zeigt nach drei Stunden Färbedauer in phosphatgepufferter alkalischer Farblösung im wesentlichen Diffusfärbung mit allen untersuchten Farbstoffen. In den ammoniakhaltigen Farblösungen verhält sich das Objekt wie folgt:

a) Mit Neutralrot sieht man fast keine Diffusfärbung, dafür sind in allen Zellen grobe Dendriten aufgetreten.

b) Mit Brillanteresylblau sind in randnahen Zellen Kugeln ausgefallen, daran schließt eine Zone mit Verschmelzungsprodukten an, und im Schnittinnern schließlich sind Dendriten zu sehen.

c) Toluidinblau bildet grobe Dendriten, oft zu Verschmelzungsprodukten zusammengezogen.

d) Mit Acridinorange sieht man in allen Zellen des Schnittes grobe Dendriten, die dunkelrot fluoreszieren. Eine Grünfluoreszenz ist nicht zu beobachten.

2. Bei *Orchis incarnata* zeichnet sich bei Färbung in ammoniakhaltigen Farblösungen gleichfalls die schon bei *Campanula persicifolia* erwähnte Zonierung ab. Im Schnittinnern befinden sich in den Zellen Dendriten, manchmal oft recht zierlich gebaute, daran anschließend etliche Zellreihen mit Verschmelzungsprodukten, während ganz am Rand des Schnittes endlich Entmischungskugeln ausgefallen sind.

3. Auch *Teucrium montanum* läßt eine zonierte Entmischung erkennen.

a) Eine Färbung mit Brillanteresylblau in phosphatgepufferter Lösung führt nur zu Diffusfärbung, während bei einem Parallelversuch in ammoniakhaltiger Lösung am Schnitttrand sehr große Kugeln, weiter innen Verschmelzungsprodukte und schließlich grobe Dendriten ausgefallen sind.

b) Genau das gleiche Färbungsbild bietet Toluidinblau.

c) Entsprechend der Auflösung der mit Rhodamin B gebildeten Entmischungskugeln durch Ammoniak treten diese in einer ammoniakhaltigen Farblösung gar nicht erst auf.

d) Mit Neutralrot entsteht nach dreistündiger Einwirkung von phosphatgepufferter Farblösung im wesentlichen Diffusfärbung. In ganz wenigen randnahen Zellen sind auch Kugeln zu beobachten. Im Parallelversuch mit NH_3 -haltiger Neutralrotlösung ist die Zahl der Kugeln bei derselben Färbedauer ungleich höher.

e) Mit Acridinorange in phosphatgepufferter Lösung kann man nach dreieinhalb Stunden hauptsächlich schöne Grünfluoreszenz feststellen. Manche randnahen Zellen erscheinen dunkel samtbraun. Bei Parallelfärbung in Acridinorange mit NH_3 $n/100$ weisen sämtliche Vakuolen diese dunkle, samtbraune Färbung auf. Eine Entmischung ist hier nicht zu beobachten.

Teucrium montanum ist im Vergleich mit manchen anderen Pflanzen, wie etwa *Phyteuma spicatum*, nicht sehr entmischungsfreudig. Es wurde schon erwähnt, daß die Neutralrot-Diffusfärbung am leichtesten zu entmischen ist. Auffallend ist die Erscheinung, daß eine Entmischung der

Färbungen mit Brillanteresylblau und Toluidinblau durch Ammoniakdämpfe nicht gelingt, eine Parallelfärbung in ammoniakhaltigen Farbbädern indessen die eben geschilderten Entmischungszonierungen verursacht.

Außer den schon genannten Objekten wurden auch noch andere Pflanzen in ammoniakhaltigen Farblösungen untersucht. So z. B. *Allium Scordoprasum*, *Amelanchier ovalis*, *Aristolochia clematidis*, *Atropa Belladonna*, *Berberis vulgaris*, *Clematis recta*, *Daphne mezereum*, *Eryngium campestre*, *Leontodon hispidus*, *Orchis latifolia*, *Phyteuma orbiculare*, *Polygonatum officinale*, *Vaccinium Vitis-Idaea*, *Viburnum Lantana* und andere. Immer konnte eine bevorzugte Entmischung und möglichst weitgehende Abrundung der Entmischungsformen im Vergleich zu phosphatgepufferten Farbstofflösungen beobachtet werden. Bei allen diesen Versuchen nahm das Rhodamin B jedoch in seinem Verhalten wiederum wie schon oft vorher eine Sonderstellung ein. Wurden die angeführten Objekte nämlich parallel in Rhodamin-B-Lösungen mit und ohne NH_3 -Zusatz gefärbt, so zeigte es sich in den meisten Fällen, daß bei Schnitten im normalen Farbbad sich Kugeln, Dendriten oder Krümel ausbildeten (im Falle von *Polygonatum* Kristalle), während eine gleich lange Färbedauer in den Zellen, die ammoniakhaltigen Lösungen ausgesetzt waren, nur eine Diffusfärbung hervorrief. Eine Ausnahme stellten solche Fälle dar, bei denen in der normalen Rhodamin-B-Lösung nur Dendriten entstanden waren, wohingegen die NH_3 -haltige Lösung neben einer Diffusfärbung noch Verschmelzungsprodukte (manchmal sehr abgerundet, fast kugelig) erzeugte. Diese Erscheinung kann man z. B. bei *Amelanchier ovalis* konstatieren, auch *Epipactis latifolia* gehört zu diesen Ausnahmen.

Überblickt man das gesamte Material der Entmischungsversuche mit Ammoniak an gerbstofffreien Zellsäften, so kann man zusammenfassend wohl sagen, daß die Diffusfärbungen flavonführender Vakuolen im allgemeinen mehr oder weniger leicht durch Ammoniak, entweder in Dampfform oder als Zusatz zu den Farblösungen, entmischbar sind. Eine bemerkenswerte Ausnahme stellte *Globularia cordifolia* dar, deren Diffusfärbungen sich weder durch Ammoniakeinwirkung noch im Dauerversuch entmischen ließen. Das Objekt war eindeutig gerbstofffrei.

C. Spontane Zonierung der Entmischungsformen bei gerbstofffreien Pflanzen

Die recht eindrucksvolle Erscheinung der zonierten Entmischungsformen trat interessanterweise manchmal auch ohne Einwirkung von Ammoniak auf. Als Beispiel dafür sei *Cornus sanguinea* angeführt (Abb. 4). Wurde ein Flächenschnitt der Blattoberseite drei Stunden lang in Neutralrot gefärbt, so enthielten die Randzellen meist eine Entmischungskugel, gelegentlich deren mehrere. Die benachbarten Zellen zeigten noch nicht völlig abgerundete Kugeln. Daran schloß sich eine Reihe von Zellen, deren Entmischung die Form von Verschmelzungsprodukten hatte, und die Zellen des Schnittinnern schließlich waren erfüllt von Dendriten. Neben diesen verschiedenen Farb-

stoff-Inhaltsstofffüllungen blieb immer noch eine deutliche Diffusfärbung erhalten. Eine Deutung dieses Phänomens ist im Augenblick noch nicht möglich. Sicherlich herrschen in den randnahen Zellen in mehrfacher Hinsicht andere Verhältnisse als im Schnittrinnern: Einerseits ist hier infolge der besseren Diffusionsmöglichkeit die Farbstoffkonzentration am höchsten.

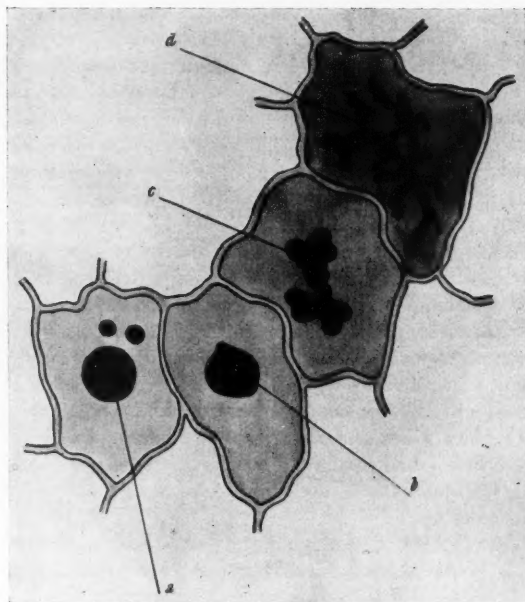


Abb. 4. *Cornus sanguinea*, Blatt, Oberepidermis. Entmischungsformen nach dreistündiger Färbung mit Neutralrot 1:10.000 in Leitungswasser. a) Entmischungskugel. b) Nicht vollständig abgerundete Entmischungskugel. c) Verschmelzungsprodukt. d) Dendrit.

andererseits können durch den Wundreiz auch Veränderungen im Zellsaft, z. B. pH-Verschiebungen, eintreten.

D. Entmischungsversuche mit Ammoniak an gerbstoffhaltigen Objekten

Bolay (1960) stellte fest, daß gerbstoffhaltige Vakuolen nach Speicherung basischer Farbstoffe in der Regel zu dendritenartiger oder krümeliger Entmischung neigen. Einige wenige Objekte jedoch zeigten nur Diffusfärbung, obwohl sie im histochemischen Versuch kräftige Gerbstoffreaktionen gaben (vgl. die Tab. 6 der zitierten Arbeit). Es wurde damals schon auf Grund gewisser Anzeichen vermutet, daß diese Diffusfärbung einen anderen physikochemischen Charakter hat als die Diffusfärbung flavonhaltiger Zellsäfte. Diese Vermutung wurde gestützt durch das verschiedene

Verhalten der beiden Vakuolentypen gegen NH_3 -Einwirkung nach Farbstoffspeicherung.

1. *Sedum maximum* bietet dafür ein recht eindrucksvolles Beispiel. In der Oberepidermis des Blattes besitzt es große Idioblasten, die sich durch außerordentlich deutliche Gerbstoffreaktionen mit den verschiedensten Reagenzien auszeichnen. Mit Vanillin-Salzsäure tritt fast augenblicklich intensive Rotfärbung und ein Körnchenniederschlag auf. Ebenso reagiert Vanillin-Schwefelsäure. Coffein 1%ig liefert nach kurzer Zeit einen dichten Tröpfchenniederschlag, dessen einzelne, im BMB zitternde Teilchen im Laufe der Zeit größere Tropfen ausbilden. Das Betupfen eines Schnittes mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd ergibt rotviolette Färbung und Eisen-(III)-chlorid tingiert die Idioblasten schön blau, während schließlich NH_3 -Behandlung einen braunen Niederschlag hervorruft. Alle diese Reaktionen weisen den Inhaltsstoff der Vakuolen eindeutig als Gerbstoff, wahrscheinlich zur Gruppe der Gallotannine gehörend, aus. Im folgenden sollen nun einige Färbungsergebnisse berichtet werden:

a) Mit Rhodamin B beobachtet man nach eineinhalb Stunden schöne Diffusfärbung, die in manchen Idioblasten mehr rotviolett, in anderen mehr blauviolett ist. Läßt man Ammoniakdämpfe wenige Sekunden bis einige Minuten einwirken, so zeigt sich eine starke Aufhellung, aber keine Entmischung der Diffusfärbung. Dies ist an sich nicht verwunderlich, da ja die durch Rhodamin B verursachten Diffusfärbungen auch bei flavonhaltigen Zellen nicht entmischbar sind. Der Unterschied zwischen gerbstoffhaltigen und gerbstofffreien Vakuolen tritt erst bei Färbung mit den folgenden Farbstoffen in Erscheinung.

b) Nach zwei Stunden Färbung in Neutralrot zeigen sich die Idioblasten diffus violettrot. Mit Ammoniakdämpfen ist auch bei längerer Einwirkung keine Entmischung zu erreichen.

c) Brillanteresylblau erzeugt ebenfalls nach zwei Stunden Diffusfärbung in den Idioblasten, in den normalen Epidermiszellen da-

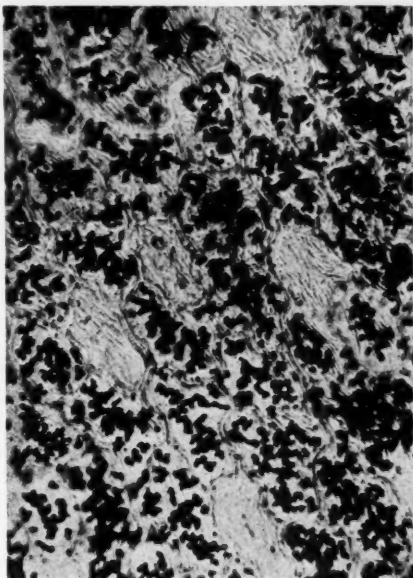


Abb. 5. *Rumex* sp., Blatt, Oberepidermis. Dendritenförmige Entmischung nach Färbung mit Neutralrot 1 : 10.000 in Leitungswasser. (Aus Bolay 1960.)

neben noch tropfige Entmischung. Die Ammoniakprobe verläuft negativ, nirgends treten in den Idioblasten Entmischungsformen auf.

d) Toluidinblau verhält sich ganz genau so und weist dieselbe Stabilität der Diffusfärbung gegen Ammoniak auf.

e) Mit Acridinorange fluoreszieren die Idioblasten nach dreieinhalb Stunden grün bis olivgrün mit schwach ockerfarbenem Einschlag. Im Hellfeld erscheinen sie schön gelbrosa. Nach der Reaktion mit Ammoniak wird die Färbung im Hellfeld eigelb, es entstehen keine Entmischungskugeln, auch eine Krümfällung ist nicht zu sehen. Im UV sind die Idioblasten jetzt dunkelbraun und haben ihre schöne Fluoreszenz verloren.

Auf Grund der Beobachtungen über den Einfluß der Färbungsdauer bei gerbstofffreien Zellsäften erhob sich die Frage nach der Entmischbarkeit einer Gerbstoff-Diffusfärbung in einem Dauerversuch. *Sedum maximum* wurde zu diesem Zweck 24 Stunden in Rhodamin B gefärbt, was nur zu Diffusfärbung führte. Das gleiche Bild liefern auch 24stündige Dauerfärbungen mit Neutralrot, Brillanteresylblau und Toluidinblau, während mit Acridinorange die Idioblasten sich nach dieser Zeit im Hellfeld dunkel ockerfarben bis braun, im UV dunkel samtbraun darboten. In allen Fällen aber bleibt ein Entmischungsversuch mit Ammoniak ohne Erfolg.

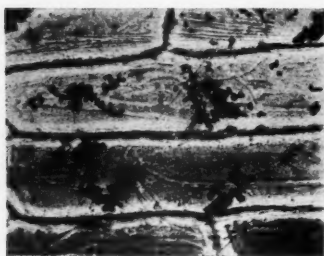


Abb. 6. In den Vakuolen der Ober-epidermis angetriebener Zwiebeln von *Allium cepa* nach Vitalfärbung mit Rhodamin B entstandene Entmischungsaggregate („Körnchen“).
(Aus Drawert 1939.)

2. Da bei flavonhaltigen Zellen manchmal festgestellt werden konnte, daß eine Entmischung mit NH_3 nach der Färbung nicht gelang, das Fär-

ben in ammoniakhaltigem Farbbad aber, wie bei *Teucrium montanum*, positive Resultate ergab, wurden auch mit einem gerbstoffführenden Objekt neben den gewöhnlichen Färbungen noch Parallelversuche in Farblösungen mit Ammoniakzusatz ausgeführt.

Sedum album hat im Parenchym Idioblasten, die sich mit den erwähnten Gerbstoffreagenzien als zweifellos gerbstoffhaltig erweisen. Mit FeCl_3 tritt allerdings keine Blau-, sondern eine Braunfärbung auf, was eher auf einen Katechingerbstoff hindeuten würde. Mit allen Farbstoffen in phosphatgepufferten Farblösungen stellt sich auch bei 18stündigem Dauerversuch nur Diffusfärbung ein. Entmischung durch Ammoniakdampf ist nicht möglich. Bei den Parallelversuchen mit NH_3 -haltigen Farblösungen fällt auf, daß die Färbungen mit Neutralrot, Brillanteresylblau, Toluidinblau und Rhodamin B zwar immer noch diffus, aber bedeutend kräftiger im Farbton sind. Die smaragdgrüne Fluoreszenz mit Acridinorange ist allerdings erloschen, statt dessen sind die Idioblasten sehr dunkel samtbraun bis fast schwarz.

Auch bei den Gerbstoffidioblasten von *Anagallis arvensis* und *Sedum*

sexangulare erweisen sich die Diffusfärbungen mit den genannten Farbstoffen als gegen Ammoniak widerstandsfähig. Entmischung ist nirgends zu erreichen. Bei *Sedum sexangulare* ist Neutralrot nach der Einwirkung von konzentrierten Ammoniakdämpfen überall schon auskristallisiert, nur die Idioblasten sind noch immer intensiv rotviolett gefärbt.

3. Da Coffein mit Gerbstoffen Tröpfchenniederschläge erzeugt, war es auch interessant, das Verhalten vitalgefärbter Gerbstoffidioblasten gegen Coffein zu untersuchen (vgl. dazu auch die Versuche von Zöttl 1960, S. 478). Schnitte von *Sedum maximum* wurden in coffeinhaltige Farbbäder eingebracht, die durch Verdünnen der Stammlösungen mit Puffer und 1%iger Coffeinelösung hergestellt worden waren. Es ergaben sich dabei folgende Färbungsbilder:

a) Mit Rhodamin B entstehen in den Idioblasten nach eineinhalbstündiger Färbung schmutziggelaviolette Tröpfchenniederschläge.

b) Neutralrot ruft nach zweistündiger Färbung in den normalen Epidermiszellen nur Diffusfärbung, in den Idioblasten dagegen eine trüb violettrote Tröpfchenfällung hervor. Dabei ist der Niederschlag in den Zellecken besonders dicht angehäuft.

c) Auch Brillantcresylblau liefert in den Idioblasten nach drei Stunden Färbezeit eine entsprechend gefärbte Tröpfchenfällung. Zwischen den einzelnen Tropfen ist auch noch eine Diffusfärbung zu erkennen.

d) Mit Acridinorange weisen die gewöhnlichen Epidermiszellen schöne Grünfluoreszenz auf, die Idioblasten sind erfüllt von einem satt ockerbraunen Tröpfchenniederschlag, die einzelnen Tröpfchen sind im Hellfeld deutlich zu erkennen.

Ergänzend sei noch bemerkt, daß auch eine nachträgliche Fällung der Diffusfärbung bei *Sedum maximum* durch Coffein möglich ist. Ein mit Neutralrot gefärbter Schnitt läßt einige Zeit nach dem Einlegen in eine 1%ige Coffeinelösung, vom Rand her einsetzend, in den kräftig violettroten Idioblasten eine Fällung von Kügelchen beobachten, die zu großen runden Gebilden und halbabgerundeten Schollen zusammenfließen.

Außerdem ist vielleicht erwähnenswert, daß in diesem Fall die durch reine Coffeinelösung bewirkte Tröpfchenfällung sich durch Übertragen in ein coffeinhaltiges Rhodamin-B-Bad anfärben läßt. Nach etwa 40 Minuten ist die grauviolette Färbung des Niederschlages schon recht deutlich.

Diese Entmischbarkeit mit Coffein bei *Sedum maximum* stellt aber



Abb. 7. *Salvinia natans*. Zelle aus dem Wasserblatt. Nach Färbung mit Rhodamin B tritt eine Krümel-Fällung auf. Die Krümel sind zarter als die Körnchen auf Abb. 6, nur die verschieden starke Vergrößerung täuscht das Gegenteil vor.

unter den bis jetzt untersuchten Objekten einen Einzelfall dar. Weder bei *Sedum album* noch bei *Sedum sexangulare* oder *Anagallis arvensis* waren durch Färbung in Farblösungen mit Coffeinzusatz Tröpfchenniederschläge zu erzielen.

Diskussion der Ergebnisse

Eines der wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, daß sich die Diffusfärbung in flavonhaltigen Zellsäften durch Ammoniak entmischen läßt, wobei die Entmischungsprodukte nach Abdiffusion des Ammoniak wieder verschwinden. Beobachtungen über reversible Entstehung von Entmischungsformen bei Vitalfärbung sind auch schon von anderen Autoren mitgeteilt worden. Gicklhorn (1932) sah in diffus gefärbten Zellsäften von *Iris flavescens* und *Iris germanica* auf einen Klopfreiz hin Entmischungstropfen entstehen und nach kurzer Zeit wieder verschwinden. Umgekehrt beobachtete der gleiche Autor (1929, 1932) ein Verschwinden von bereits vorhandenen Entmischungskugeln bei Plasmolyse und ihr neuerliches Auftreten bei Deplasmolyse (*Symphoricarpus racemosus* und *Cirsium oleraceum*). Elsner (1932) hat dieses Phänomen an weiteren Pflanzen untersucht und neben gleichartigen auch gegensätzliche Fälle gefunden, bei denen nach Plasmolyse Entmischungen auftraten und bei Deplasmolyse wieder verschwanden. Bank (1937) konnte durch Kombination von Methylenblau, Neutralrot und Salzlösungen reversible Entmischungen erzielen.

Die Ansätze zu einer theoretischen Durchdringung dieser Erscheinungen sind bis jetzt noch recht mager. In jedem Lehrbuch der physikalischen Chemie (vgl. z. B. Netter 1959, S. 207) ist das Mischungsdiagramm des Systems Phenol—Wasser abgebildet, das eine ausgeprägte Mischungslücke aufweist. Mehrstoffsysteme scheinen nach dieser Richtung hin noch nicht untersucht worden zu sein. Ergiebiger für das besprochene Problem dürfte die Theorie der Koazervation im Sinne von Bungenberg de Jong sein (vgl. Booi j und Bungenberg 1956). Die zitierte Darstellung bezieht sich zwar vor allem auf kolloidale Substanzen, die dort mitgeteilten Erscheinungen zeigen aber in vieler Hinsicht Ähnlichkeit mit den hier betrachteten Entmischungen, z. B. in der starken Abhängigkeit von der Salzkonzentration.

Indessen sollen hier nicht die physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten dieser Erscheinungen diskutiert werden, sondern ihre Brauchbarkeit für Aussagen über die Zusammensetzung des Zellsaftes. Es läßt sich auf Grund der mitgeteilten Ergebnisse der Schluß ziehen, daß die flavonhaltigen Zellsäfte ganz allgemein zur Bildung von Entmischungskugeln neigen, sei es, daß sie solche bei Vitalfärbung spontan ausbilden, sei es, daß zunächst nur Diffusfärbung eintritt und die Entmischung erst durch Einwirkung von Ammoniak angeregt wird. Im letzteren Falle ist wohl die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration im Zellsaft entscheidend, es könnte aber auch sein, daß die bei der Neutralisation der Zellsaftsäuren entstehenden NH_4 -Ionen eine Rolle spielen. Die Konzentration des Ammoniaks im Zellsaft beeinflusst auch die Konsistenz der entstehenden Entmischungsprodukte

(vgl. S. 182): Läßt man Ammoniak länger auf die gefärbten Schnitte einwirken, so können die zuerst entstehenden Tropfen sich in Sphärrokristalle verwandeln. (Dies tritt übrigens gelegentlich auch ohne NH_3 ein, vgl. Abb. 8.) Wenn zuerst mit Ammoniak behandelt und nachträglich gefärbt wird, dann entstehen zuerst Krümel, die sich in dem Maße, wie der Ammoniak abdiffundiert, in Dendriten und schließlich in Tropfen verwandeln. Der Ammoniak hat also auch einen Einfluß auf die Viskosität der Entmischungsprodukte. Diejenigen Entmischungsformen, die zu Tropfen zusammenfließen können, müssen ja flüssig sein, diejenigen, die zu Dendriten verkleben, sind wohl höchst viskos bis fest. Auch für diese Erscheinung gibt es keine befriedigende physikalisch-chemische Theorie. Wohl hat schon Loeb (1920) Versuche über die pH-Abhängigkeit der Viskosität von Gelatine-Lösungen angestellt (vgl. dazu auch Höber 1926, S. 220), Weber (1921) hat die Abhängigkeit der Viskosität des Zellsaftes von pH und Konzentration diskutiert, Netter (1959, S. 323) behandelt den elektroviskösen Effekt bei makromolekularen Elektrolyten, aber alle diese Angaben lassen keine direkten Schlüsse auf die von uns untersuchten Erscheinungen zu. Das Studium derselben wäre eine sehr reizvolle Aufgabe für die physikalisch-chemische Forschung. Leider hat das Interesse für Kolloidchemie in letzter Zeit etwas abgenommen.

Anders als die flavonhaltigen Zellsäfte reagieren gerbstoffführende Vakuolen: Wenn sie nach Vitalfärbung spontane Entmischung zeigen, dann erfolgt diese in Gestalt von Dendriten oder Krümel. Wenn zunächst nur Diffusfärbung auftritt, dann verändert sich das Färbbild auch nach Zusatz von Ammoniak nicht. Dies bedeutet eine Erhärtung der schon früher (Bölay 1960) vorgetragenen Hypothese, daß die Diffusfärbung bei gerbstoffhaltigen Zellsäften einen anderen physikochemischen Charakter besitzt als die Diffusfärbung flavonhaltiger Zellsäfte. Weitere, schon früher beigebrachte Hinweise dafür sind z. B. die Beobachtung, daß mit Brillantcresylblau die Diffusfärbung gerbstoffhaltiger Vakuolen nicht blaugrün aussieht wie diejenige flavonhaltiger Zellsäfte, sondern ultramarinblau. Mit

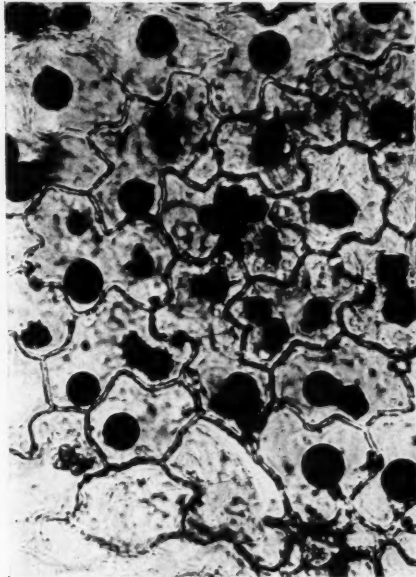


Abb. 8. *Campanula rapunculoides*, Blatt, Oberepidermis. Kugelige, langsam kristallin werdende Entmischung nach Färbung mit Neutralrot 1:10.000 in Leitungswasser. (Aus Bölay 1960.)

Acridinorange fluoreszieren diese Zellsäfte sehr oft nicht grün, sondern in einem stumpfen Braun bzw. Rotbraun. Da in ähnlichen rötlichen Farbtönen auch die bei anderen Gerbstoffvakuolen entstehenden Krimelfällungen fluoreszieren, so lag die Annahme nahe, daß bei manchen Gerbstoffvakuolen die Fällung so fein ist, daß sie mikroskopisch nicht mehr aufgelöst werden kann und als Diffusfärbung erscheint. Wir haben es also mit einer

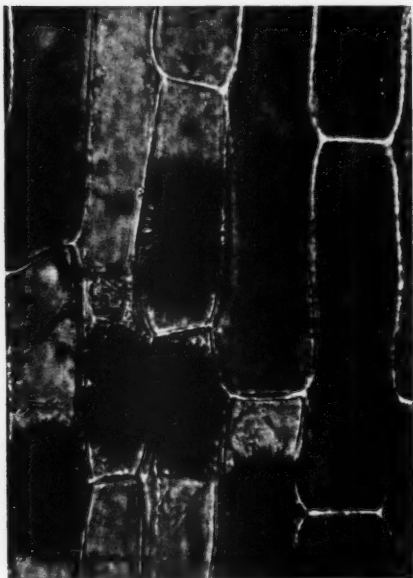


Abb. 9. *Polygonatum multiflorum*, Blatt, Oberepidermis. Kristalline Entmischung nach Färbung mit Rhodamin B 1:5000. (Aus Bolay 1960.)

kolloidalen Lösung des Reaktionsproduktes Gerbstoff-Farbstoff zu tun. Ein solches Kolloidalwerden von Niederschlägen kommt ja, wie schon in der Einleitung erwähnt, bei sehr schwer löslichen Verbindungen oft vor. Ein weiterer Hinweis auf die kolloidale Natur der Gerbstoff-Diffusfärbung ist die Beobachtung, daß nach Speicherung von Rhodamin B manchmal mehr rotviolette, manchmal blaviolette Farbtöne auftreten, wohl je nach dem Dispersitätsgrad der submikroskopischen Ausfällung.

Überblickt man die bei der Vitalfärbung voller Zellsäfte mit basischen Farbstoffen möglichen Färbebilder, dann kann man aus ihnen eine lückenlose Reihe von Erscheinungen zusammenstellen, die durch gleitende Übergänge miteinander verbunden sind:

1. Speicherung einer molekular-löslichen Verbindung des Inhaltsstoffes mit dem Farbstoff. Durch pH-Änderung nach der alkalischen Seite wird offenbar die Löslichkeit dieser Verbindung in Wasser herabgesetzt, es tritt eine Entmischung in Form flüssiger, zusammenfließender Tropfen, seltener auch in Form von Krümeln, auf (echte „Diffusfärbung“).

2. Auch ohne künstliche pH-Änderung wird die Löslichkeitsgrenze bald überschritten, es tritt eine spontane Entstehung von flüssigen zusammenfließenden Tropfen ein („Entmischungskugeln“, Abb. 3, S. 186). Diese Entmischungskugeln können sich nach einiger Zeit zu Sphärrokristallen umwandeln (Abb. 8). Auch eine spontane Entstehung von Kristallen dürfte eng mit dieser Erscheinung zusammenhängen (Abb. 9).

3. Die zuerst entstehenden Entmischungstropfen verfestigen sich langsam und fließen nur unvollkommen zusammen („Verschmelzungsprodukte“, Abb. 4).

4. Die zuerst entstehenden kleinen Entmischungströpfchen verfestigen sich ziemlich rasch und fließen nicht zusammen, sondern verkleben untereinander („Dendriten“, Abb. 5). Hierher sind auch die sogenannten „Körnchenfällungen“ zu stellen, die man als „zarte Dendriten“ bezeichnen könnte („Drawertsche Körnchen“ in der Innenepidermis austreibender Zwiebeln, vgl. Abb. 6 sowie Bancher und Hölzl 1960, Abb. 7).

5. Bei Einwirkung des Farbstoffes werden feinste feste Partikel gefällt, die sich zu flockigen Aggregaten zusammenschließen („Krümfällung“, Abb. 7).

6. Der entstehende Niederschlag bleibt in submikroskopischen Dimensionen bzw. in kolloidaler Lösung. Die Einwirkung von Ammoniak hat keine Veränderung des Färbbildes zur Folge (unechte „Diffusfärbung“, Abb. 1).

Diesem Schema lassen sich nahezu alle Erscheinungen einfügen, die bei Vitalfärbung der Zellen höherer Pflanzen mit basischen Farbstoffen beobachtet worden sind. Natürlich wird es, zumal unter den niederen Pflanzen, Sonderfälle geben, wie z. B. die von Höfler und Kinzel (1960) beschriebenen Zellsäfte der Rotalge *Dasya squarrosa*.

Eine überlegende Betrachtung der obenstehenden Reihe 1–6 zeigt, daß hier zwei Prinzipien wirksam sein müssen: Am einen Ende der Reihe steht die Bildung einer molekular-löslichen Verbindung. Dieses Verhalten zeigen die flavonhaltigen Zellsäfte. Am anderen Ende der Reihe stehen die gerbstoffhaltigen Zellsäfte, die eine vollkommen unlösliche Verbindung Farbstoff-Inhaltsstoff geben. Die dazwischen liegenden Übergänge zwischen beiden Extremen könnten so zustande kommen, daß in den betreffenden Zellsäften verschiedenartige Mischungsverhältnisse zwischen beiden Typen von Verbindungen enthalten sind. Darauf weist die Beobachtung von Bolay (1960) hin, daß diejenigen gerbstoffhaltigen Vakuolen, die mit basischen Farbstoffen dendritenartige Entmischungen zeigen, stets zu Epidermiszellen gehören, die in der Regel auch Flavon enthalten. Diejenigen gerbstoffhaltigen Idioblasten, die nur Diffusfärbung (submikroskopische Fällung) zeigen, liegen jedoch oft im Parenchym und enthalten kein Flavon. Demnach würde also ein zusätzlicher Gerbstoffgehalt verfestigend auf eine Farbstoff-Flavon-Entmischung wirken, während andererseits eine Farbstoff-Gerbstoff-Fällung durch einen zusätzlichen Flavongehalt mehr oder weniger stark verflüssigt werden würde. Da aber die Zahl der möglichen Zellsaft-Inhaltsstoffe sehr groß ist, wäre es auch möglich, daß es Stoffe mit mehr „flavonoidem“ oder mehr „tannoidem“ Verhalten mit allen Abstufungen dazwischen gibt. Es sei ferner daran erinnert, daß das Färbbild auch von den Versuchsbedingungen abhängig ist: wenn der Zellsaft durch Ammoniak künstlich alkalisch gemacht wird, dann können Flavone ein „tannoides“ Verhalten zeigen, indem sie in Form von Krümeln ausfallen, die sich im Maße der Abdiffusion des Ammoniak mehr und mehr in die typische „flavonoide“ Entmischungsform (Tropfen) verwandeln (vgl. S. 184).

Die einzelnen Farbstoffe zeigen übrigens verschiedene starke Neigung zur Bildung von Entmischungen. Bei den schwachen Basen (Rhodamin B und

Neutralrot) ist diese Neigung größer als bei den stärkeren Basen (Brilliantcresylblau, Toluidinblau und Acridinorange).

Will man nun die Entmischungsformen bei Vitalfärbung voller Zellsäfte mit basischen Farbstoffen² diagnostisch auswerten, so wird man folgendermaßen vorgehen können: Liegt eine Diffusfärbung vor, dann muß man versuchen, diese durch Behandlung mit Ammoniak (vgl. S. 182) zu entmischen. Tritt hierbei eine Entmischung auf, dann kann man die Anwesenheit von Flavonoiden und die Abwesenheit von Gerbstoffen annehmen. Ebenso ist eine spontane Entstehung von Entmischungstropfen

(ohne Ammoniakwirkung) oder von Kristallen zu werten.

Läßt sich eine intensive Diffusfärbung mit Ammoniak nicht entmischen, dann liegt die Vermutung nahe, daß nur Gerbstoffe und keine Flavone vorliegen. Man wird in diesem Falle gut daran tun, einen zweiten ungefärbten Schnitt mit einer Coffeinelösung zu behandeln, um den Gerbstoffgehalt sicherzustellen.

Die anderen Fälle der oben wiedergegebenen Reihe 1–6 bedeuten allem Anschein nach einen zunehmenden Gerbstoff- und abnehmenden Flavongehalt der betreffenden Zellsäfte bzw. zunehmend „tannoiden“ und abnehmend „flavonoiden“ Charakter der betreffenden Inhaltsstoffe. Man wird aber auch die

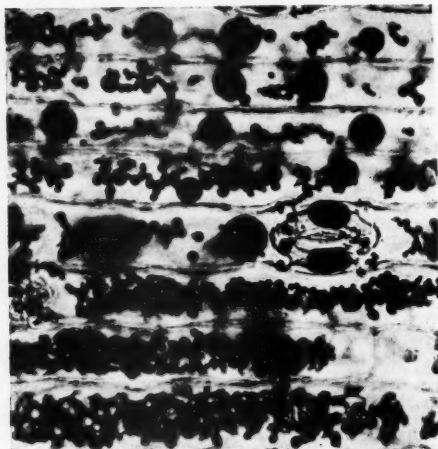


Abb. 10. *Coldicum autumnale*, Blatt, Ober-epidermis. Kugelige und dendritenartige Entmischung nach Färbung mit Neutralrot 1 : 10.000 in Leitungswasser und anschließender Behandlung mit NH_3 -Dämpfen.

Möglichkeit in Betracht ziehen müssen, daß sich ein- und derselbe Stoff je nach dem Zustand des Zellsaftes (pH, Salzgehalt u. dgl.) verschieden verhalten kann.

Erweist sich ein Zellsaft vitalfärberisch als „leer“ im Sinne von Höfler 1947 (zur exakten Feststellung des „leeren“ Charakters vgl. Höfler und Schindler 1955 sowie Kinzel und Imb 1961, S. 424), dann kann auf die Abwesenheit aller derartigen Verbindungen geschlossen werden.

² Methodische Angaben zur Vitalfärbung finden sich bei Strugger 1949, die neueren theoretischen Vorstellungen bei Drawert 1956 und Kinzel 1954, 1958, 1959. Für den vorliegenden Fall wird man als Farbstoffe wohl am besten Neutralrot bei pH 7–8 oder Brilliantcresylblau bei pH 9–10 verwenden. Es sei aber betont, daß eine exakte und sinnvolle Durchführung der angegebenen Reaktionen nur auf Grund einiger vitalfärberischer Erfahrung, etwa nach Durcharbeit der im Struggerschen Praktikum angegebenen Versuche, möglich ist.

In dieser Form stellt die Vitalfärbung von Zellsäften eine wertvolle Ergänzung (aber selbstverständlich keinen Ersatz) der üblichen histochemischen Reaktionen dar. Darüber hinaus ist sie (neben der Ammoniak- und der Coffeinreaktion) eine der wenigen Möglichkeiten, an lebenden Zellen chemische Reaktionen durchzuführen.

Wie wohl bei jeder Regel auf biologischem Gebiet, so gibt es auch hier Ausnahmen und ungeklärte Erscheinungen. So zeigen manche Objekte ein uneinheitliches Färbebild: es entstehen etwa mit einem Farbstoff Dendriten, mit einem anderen Entmischungstropfen (vgl. Boley 1960, Tabelle 4). Ganz selten können sogar Dendriten und Tropfen in der gleichen Zelle vorkommen (Abb. 10). Ungeklärt ist ferner das abweichende Verhalten des Rhodamin B, bei dem die Neigung zur Entmischung durch Ammoniak nicht gefördert, sondern gehemmt wird. Ein interessantes Problem ist auch die gegensätzliche Wirkung von Ammoniak und Coffein: Ammoniak erzeugt in gefärbten flavonhaltigen Zellsäften meist Entmischung, nicht aber in gerbstoffhaltigen, Coffein hingegen gibt manchmal in gerbstoffhaltigen gefärbten Zellsäften Entmischung, verhindert eine solche aber in flavonhaltigen Zellsäften (vgl. S. 186 und S. 193). Indessen gehören diese letzteren Erscheinungen weniger in das Gebiet der Biologie als in das der Kolloidchemie.

Zusammenfassung

Eine diffuse Speicherung basischer Farbstoffe in Vakuolen von Pflanzenzellen kann in dreierlei verschiedenen Fällen zustande kommen:

A. Die sogenannten „leeren“ Zellsäfte speichern Farbstoffkationen nach dem „Ionenfallenprinzip“ (Höfler 1947, 1949, Kinzel 1959). Der Farbtön ist hierbei „positiv metachromatisch“ (vgl. Kinzel 1958). Ein Zusatz schwacher NH_3 -Lösung bewirkt eine vitale Entfärbung durch pH-Änderung des Zellsaftes und Exosmose der Farbbase (Höfler 1948).

B. Bei den sogenannten „vollen“ Zellsäften im Sinne von Höfler (1947) findet diffuse Speicherung meist in solchen Vakuolen statt, die Flavonglykoside, aber keine Gerbstoffe enthalten. Es kommt dabei zu einer chemischen Bindung des Farbstoffes an den betreffenden Vakuolen-Inhaltsstoff. Die entstehende Verbindung bleibt in echter Lösung. Der Farbtön ist „negativ metachromatisch“. Ein Zusatz von Ammoniak hat in diesen Fällen in der Regel eine Entmischung zur Folge: Es fallen im Zellsaft Tröpfchen oder Körnchen aus, die den größten Teil des Farbstoffes, wohl noch immer an den Zellinhaltsstoff gebunden, enthalten.

C. Diffuse Farbspeicherung wurde schließlich auch bei gewissen Epidermis- und Mesophyll-Idioblasten beobachtet, die reichlich Gerbstoff, aber keine oder nahezu keine Flavone enthalten. Auf Grund früher (Boley 1960) mitgeteilter Beobachtungen war vermutet worden, daß es sich in diesem Falle nur um eine scheinbare Diffusfärbung handle. Die Verbindung zwischen den Zellinhaltsstoffen und dem Farbstoff dürfte hier so unlöslich sein, daß sie in Form einer submikroskopischen Fällung, also in kolloidaler Größenordnung, auftritt. Diese Vermutung konnte nun durch die Beobach-

tung erhärtet werden, daß in solchen Fällen die „Diffusfärbung“ durch einen Zusatz von Ammoniak nicht entmischt werden kann.

Die zwei Formen der Diffusfärbung voller Zellsäfte (B und C) lassen sich mit den sehr zahlreichen Fällen, bei denen es nach vitaler Farbspeicherung zu mannigfaltigen Entmischungs- und Fällungserscheinungen kommt, zu einer lückenlosen Reihe ordnen. An deren Anfang steht die echte Diffusfärbung, gefolgt von den Entmischungskugeln, den Dendriten und der Krümfällung bis zur scheinbaren Diffusfärbung (submikroskopischen Ausfällung) am unteren Ende der Reihe (vgl. die Übersicht auf S. 196 f.).

Die diagnostische Bedeutung dieser verschiedenen Färbebilder liegt darin, daß sich mit ihrer Hilfe gewisse Schlußfolgerungen auf die Art der Inhaltsstoffe der betreffenden Zellsäfte ziehen lassen: eine echte (entmischbare) Diffusfärbung voller Zellsäfte oder eine tropfige bzw. kristallinische Entmischung deuten auf einen Gehalt an Flavonoiden hin, während feinkrümelige oder submikroskopische Ausfällung (unechte Diffusfärbung) einen Gehalt an Gerbstoffen vermuten lassen. Die dazwischenliegenden Glieder der angeführten Reihe bedeuten dann sinngemäß verschiedenartige Gemische dieser beiden Verbindungstypen bzw. einen mehr „flavonoiden“ oder mehr „tannoiden“ Charakter der betreffenden Inhaltsstoffe.

Erweist sich ein Zellsaft nach Speicherung basischer Farbstoffe als „leer“ (im vitalfärberischen Sinne), dann kann auf die Abwesenheit aller derartigen Verbindungen (deren gemeinsame Eigenschaft der Besitz phenolischer OH-Gruppen ist), geschlossen werden.

Es sei aber nochmals betont, daß diese Vitalfärbereaktionen zwar nicht Beweise, sondern nur Hinweise für die Anwesenheit der betreffenden Substanzen zu geben vermögen, diese aber *in vivo*.

Literatur

- Bank, O., 1937: Entmischung der gefärbten Vakuolenkolloide durch Farbstoffe. *Protoplasma* 27, 367.
- Bolay, E., 1960: Die Vitalfärbung voller Zellsäfte und ihre cytochemische Interpretation. S. B. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. 1, Bd. 169, S. 269.
- Booij, H. L., und H. G. Bungenberg de Jong, 1956: Biocolloids and their interactions. *Protoplasmatologia*, Handbuch der Protoplasmaforschung, hrsg. v. L. V. Heilbrunn und F. Weber, Band 1/2.
- Cholnoky, B. v., und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. S. B. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. 1, Bd. 159, S. 143.
- Drawert, H., 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. *Planta* 29, 376.
- 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, hrsg. v. W. Ruhland, Bd. II, S. 252.
- Elsner, W., 1932: Wirkungen des Methylenblaus auf die lebende Pflanzenzelle. *Z. wiss. Mikroskop. mikroskop. Techn.* 49, 28.
- Flasch, A., 1955: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen. *Protoplasma* 44, 412.
- Gicklhorn, J., 1929: Beobachtungen über die vitale Farbstoffspeicherung. *Kolloid-Beih.* 28, 367.

- Gicklhorn, J., 1929: Kristalline Farbstoffspeicherung in Protoplasma und Zellsaft pflanzlicher Zellen nach Vitalfärbung. *Protoplasma* 7, 341.
- 1932: Beobachtungen zu Fragen über Form, Lage und Entstehung des Golgi-Apparates. *Protoplasma* 15, 365.
- Härtel, O., 1951: Gerbstoffe als Ursache voller Zellsäfte. *Protoplasma* 40, 338.
- Höber, R., 1926: Physikalische Chemie der Zellen und der Gewebe. Leipzig.
- Höfler, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? *Mikroskopie* 2, 13.
- 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S.B. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. Abt. 1, Bd. 156, S. 585.
- 1949: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biologia generalis* 19, 90.
- und H. Kinzel, 1960: Über den Speicherstoff in den „vollen“ Zellsäften der Rotalge *Dasya squarrosa*. Anz. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Jahrg. 1960, Nr. 10, S. 237.
- und H. Schindler, 1955: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. *Protoplasma* 45, 175.
- Kinzel, H., 1954: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Farbstoffe in leeren Zellsäften. *Protoplasma* 44, 52.
- 1958: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. *Protoplasma* 50, 1.
- 1959: Über Gesetzmäßigkeiten und Anwendungsmöglichkeiten der Zellsaft-Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen. Ber. dtsch. bot. Ges. 72, 253.
- und R. Imb, 1961: Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo. *Protoplasma* 53, 422.
- Loeb, J., 1920: Ion series and the physical properties of proteins. *Journ. Gen. Physiol. (Am.)* 3, 85 und 391.
- Molisch, H., 1923: Mikrochemie der Pflanze. 3. Aufl. Jena.
- Netter, H., 1959: Theoretische Biochemie. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Pfeffer, W., 1886: Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. Bot. Inst. Tübingen* 2, 179.
- Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Vries, H. de, 1871: Sur la perméabilité du protoplasma des betteraves rouges. *Archives Néerlandaises des sciences exactes et naturelles* 6, 117.
- Weber, F., 1921: Die Zellsaftviskosität lebender Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. 39, 188.
- Zöttl, P., 1960: Vitalfärbestudien mit Methylrot. *Protoplasma* 51, 465.

Osmotisch bedingte polare Verlagerungen im Protoplasten von *Cladophora prolifera*

Von

Karl Höfler

Aus der Stazione Zoologica Napoli und dem Pflanzenphysiologischen Institut der
Universität Wien

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Februar 1961)

Cladophora prolifera (Roth) Kütz. bildet kräftige dunkelgrüne Rasen aus steif aufrechten Stämmchen, die ziemlich gleich hoch verzweigt sind. Die cönocytischen Zellen sind sehr groß, in den basalen Thallusgliedern 300—400 μ , in den Ästen 130—300 μ breit und 6—12mal so lang. Die Alge, die mit keiner anderen verwechselt werden kann, wächst in Neapel „das ganze Jahr an geschützten Stellen des Innen- und Außengolfes auf Steinen meist in geringer Sichttiefe, vereinzelt auch in den Posidoniawiesen von 30 m Tiefe“ (F u n k 1927, S. 316), geht aber nicht hinauf bis in die Gezeitenzone und meidet starkes Licht. Ich habe mit der Spezies seit 1929/30 mehrfach gearbeitet, sie zumal bei meinen vergleichenden Plasmolyseversuchen verwendet, und habe damals (1932) in der Zeitschrift *Protoplasma* das Plasmolyseformverhalten der Zellen beschrieben.

I. Versuche

In Stämmchen der Alge, die ich drei Tage lang in hypertonischem, 2fach eingeeengtem Seewasser belassen hatte, beobachtete ich am 19. April 1930 auffallende Inhaltsverlagerungen. Mein damaliges Protokoll verzeichnet: „An der Basis aller Protoplasten waren die Chlorophyllkörper dunkelschwarzgrün angereichert.“ Die Stämmchen, die anfangs stark konkav plasmolysiert gewesen waren, zeigten im 2fach konz. Seewasser in den oberen Zellen nach drei Tagen noch Plasmolyse, die jetzt ziemlich gute kugelig-konvexe Endform erreicht hatte, während in den tieferen Zellen der Stämmchen die Plasmolyse zurückgegangen war. Die basale Verlagerung war in beiderlei Zellen zu sehen. Bei der Wiederholung der Versuche (19. bis 22. April 1930) wurden die Stämmchen teils aufrecht, teils invers, mit den

basalen Enden nach oben, in Glasgefäßen mit 2fachem Seewasser montiert. Die oberen, noch plasmolysierten, und etliche weitere, jetzt deplasmolysierte Zellen zeigten die polare schwarzgrüne Anreicherung im morphologisch basalen Zellteil. Im apikalen Teil erschien der Chloroplastenbelag entsprechend stark gelockert (vgl. Abb. 1—3).

Cladophora prolifera ist eine recht lebenskräftige und resistente Alge und erscheint schon deshalb zur Verwendung bei zellphysiologischen Versuchen vorzüglich geeignet. Nach Wien gebrachtes Material hielt bei der Kultur in Neapeler Seewasser ohne Durchlüftung viele Monate lang aus. Ich habe im Frühjahr 1930 und dann mehrmals zu verschiedener Jahreszeit an Material, das aus Neapel gesandt worden war, den Grundversuch wiederholt, der sich als sicher reproduzierbar erwiesen hat.

Als ich nun im April 1960 zum erstenmal seit 25 Jahren die Station Zoologica wieder bezog, stand die Untersuchung der polaren Verlagerung auf meinem Arbeitsprogramm. Ich sammelte bei der ersten Exkursion am 14. April eigenhändig gutes Material der dunkelgrünen aufrechten Büschel auf einem schattigen Stein $\frac{1}{2}$ m unter dem Niveau und brachte etwa 2 cm lange Stücke von ein und demselben kräftigen Sträuchlein in eine Konzentrationsreihe eingengten Seewassers. Die Lösungen waren in gewohnter Weise durch langsames Eindampfen reinen Seewassers auf dem Wasserbad bei 65—70° C und volumetrische Mischung des (hier auf das 2,87fache) eingengten mit einfachem Seewasser hergestellt worden.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Verlagerungsreaktion war vordem noch nicht geprüft worden. Nicht nur in 2,0, sondern auch in 1,9 und 1,8 Seewasser trat binnen 2—3 Tagen prächtige Basalverlagerung ein. In 1,7 Seewasser zeigten nur einige Zellen die schwarzgrüne Anreicherung. In 1,6 Seewasser und darunter war die Verlagerung ausgeblieben. In 1,7 Seewasser war die hier anfänglich bewirkte Plasmolyse zurückgegangen; Ästchen der Alge mit verlagerten Zellen, die aus 1,7fachem in stärker hypertonisches, 2,5faches Seewasser übertragen wurden, ließen da normale Plasmolyse mit flach konkaven Buchten eintreten.

In 1,8 Seewasser ergab sich optimale Wirkung. Abb. 1—3 zeigt den Erfolg von im Mai 1960 in Wien ausgeführten Versuchen; die Verlagerung erreichte freilich nicht das optimale Maß wie bei einem Teil der in Neapel durchgeführten Versuche. Ich wählte diese Konzentration für die Mehrzahl der weiteren Versuche.



Abb. 1.

Bei stärkerer Vergrößerung läßt sich erkennen, daß die schwarzgrüne Färbung der Zellbasis durch starke Anreicherung der Plastiden bewirkt wird. *Cladophora prolifera* hat freie Plastiden. In der normalen Zelle ist das aus einschichtiger Lage bestehende Mosaik mäßig dicht. Man sieht größere und kleinere, rundliche oder vieleckige Plastiden regellos vermengt, eine Anordnung in Längsreihen fehlt. Durch den Besitz sehr deutlich sichtbarer Pyrenoide erhalten die Plastiden ihre Individualität (Abb. 4, 5). Die

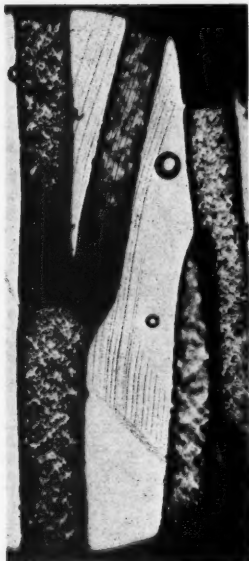


Abb. 2.

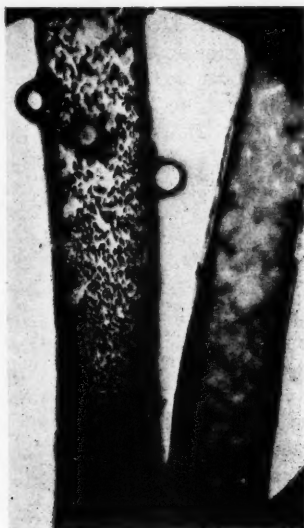


Abb. 3.

basal verlagerten Plastiden liegen dicht gedrängt und zeigen sich meist in Profilstellung. In der oberen, apikalen Zellhälfte erscheint der Belag entsprechend aufgelockert und die Einzelplastiden (Abb. 5) werden deutlich sichtbar. Manche enthalten Stärke, andere sind frei von Körnchen.

Bei Beobachtung nach mehreren, mitunter auch schon nach drei Tagen ist das Plastidengedränge am Zellgrund gelockert, aber das dichte Mosaik reicht von der basalen Zellquerwand, scharf abgesetzt, nur bis zu gewisser Höhe. Es schließt dort unvermittelt an den aufgelockerten Restbelag aus Plastiden an, die oft noch früher als die basalen Plastiden nekrotische Veränderungen zeigen.

Im 2fachen Seewasser, wo sich fast allgemein nach 2–3 Tagen noch starke Plasmolyse erhalten hat, finden sich zerteilte Protoplasten mit axialen, die Teile verbindenden Plasmasträngen. Ich habe wiederholt beobachtet, daß hier nur die basalen Teilprotoplasten die schwarzgrüne Plastidenhäufung zeigen, während die apikalen keine oder nur ganz schwache Ver-

lagerungsreaktion erkennen lassen. Die Konturen erscheinen hier ziemlich gleichmäßig dick von Plastiden gesäumt, die sich nur in der Profilsansicht an den Längsseiten schwärzlichgrün, in der Fläche reingrün präsentieren. In den unteren Teilprotoplasten sind bisweilen die apikalen Kuppen ganz frei von Plastiden, was erkennen läßt, daß der ganze Plastidenbelag hinabgerückt sein muß.

Basale Schwärzung hat sich in den oberen Zelletagen überall eingestellt, so auch in Zellen mit noch konkaver Plasmolyse, bei denen die Plasmolyse-



Abb. 4.

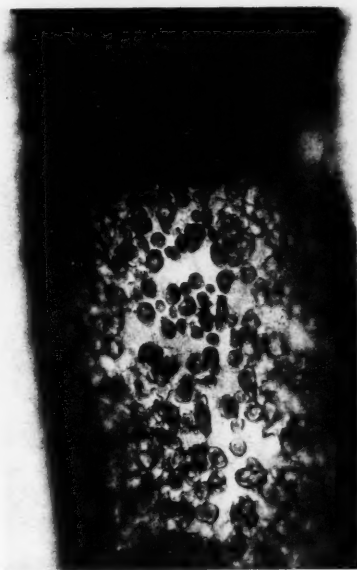


Abb. 5.

endform nicht erreicht worden ist. Die Reaktion fehlt nur in den breiten unteren Zellen der Stämmchen. Diese sind deplasmolysiert oder nur noch schwächer als die oberen plasmolysiert. —

Es galt nun vor allem festzustellen, wie der Verlagerungseffekt mit den plasmolytischen Grenzwerten der Zellen zusammenhängt. Sind die an der Zellbasis polar erfolgenden Anreicherungen mit der allbekannten Systrophe (Küster 1910, 1956, Germ 1952 f. u. a.) plasmolysierter Gewebszellen höherer Pflanzen vergleichbar? Ist Hypertonie des Mediums oder ist der Plasmolysereiz wirksam? Ich teile zwei von den Versuchen in abgestuften Seewasserkonzentrationen mit, den ersten, der seit dem 14. April lief, und den letzten, am 4. Mai 1960 eingeleiteten, bei dem die Lösungsreihe im Grenzbereich feiner, nämlich in Stufen von 0,05 Seewasser gestuft war.

Neapel, 14. April 1960

Die 2–3 cm langen Stämmchen der am Vormittag gesammelten Alge wurden in die Fläschchen mit eingegstem Seewasser eingetragen und nach 30–50 Min. unter großen Deckgläsern untersucht. *T* im großen Standglas 20° C, in den Fläschchen 21–22° C. Die Stämmchen nach der Durchsicht in die Fläschchen zurückgebracht.

2,0 f a c h Seewasser: Schöne konkave Plasmolyse überall von den obersten bis in die unteren Zellen.

1,8 Seew.: Auch schöne konkave Plasmolyse überall, doch in den untersten Zellen deutlich schwächer.

1,7 Seew.: Überall gute flachkonkave Plasmolyse entsprechend schwächeren Grades.

1,6 Seew.: Schwache Plasmolyse in weitem flach-konkaven Bogen; oben überall, unten meist Grenzplasmolyse.

1,5 Seew.: Scheitelzellen und obere Zellen klare Grenzplasmolyse, etwa von der 4. Zelletage an meist keine Plasmolyse mehr.

1,4 Seew.: Keine Plasmolyse, meist auch nicht in den Scheitelzellen; hie und da scheinen hier in den Kuppen die Protoplasten ganz minimal abgehoben.

1,3 Seew.: Nirgends Plasmolyse!

2,5 Seew.: Starke, tiefbuchtige konkave Plasmolyse.

Durchsicht des Versuches nach 15 Stunden, am 15. April:

2,0 Seew.: Allgemein noch Plasmolyse, Konturen zum Teil konvex, zwischen geteilten Protoplasten farblose plasmatische Verbindungsfäden; bei ungeteilten oft Protoplaste von den Längsseiten der Zellen weit und flach abgehoben. Die unteren Zellen der Hauptäste zeigen zum Teil keine klare Plasmolyse mehr.

1,8 Seew.: In den Scheitelzellen z. T. noch Plasmolyse, in der Mehrzahl diese zurück, tiefere Zellen etwa von der 5. Etage an durchwegs deplasmolysiert. — Ergebnis der Durchsicht mehrerer Stämmchen: nur etwa ein Viertel der Endzellen noch plasmolysiert, dazu ein Teil der zweit- und drittobersten Zellen.

1,7 Seew.: Die meisten Zellen deplasmolysiert, weniger als ein Zehntel der Scheitelzellen und der nächst obersten noch schwach plasmolysiert, alle in bestem Zustand.

1,6 Seew.: Völlig deplasmolysiert, alles intakt.

1,5 Seew.: Alles unplasmolysiert, ganz intakt.

1,4 Seew. und 1,3 Seew.: Alles unplasmolysiert, intakt.

Durchsicht nach weiteren 24 Stunden, am 16. April. *T* = 20° C:

2,0 Seew.: Fast allgemein noch starke Plasmolyse, Menisken jetzt ziemlich gut konvex, oft halbkugelig; so in allen Scheitelzellen und den Zellen der 2. und 3. Etage. Von den tieferen Zellen die meisten nur mehr schwach längsabgehoben, ein Teil deplasmolysiert. In den oberen Zellen Plasmolysegrad vielfach meßbar. z. B. in einer 150–160 μ breiten Zelle mit zweigeteiltem Protoplasten $G = 0,82$. Jetzt ist basale Schwärzung überall, in den konvex und konkav plasmolysierten Zellen eingetreten. In einer Endzelle mit geteiltem Protoplasten ist nur im basalen Teilprotoplasten basale Verlagerung eingetreten, der größere obere zeigt keine Plasma- und Plastidenanreicherung an der Basis (der Verbindungsstrang der Protoplasten ist recht breit, Durchmesser 3 μ , am breiter angeschwollenen Ende 4 μ). — Alleinige Verlagerungsreaktion in den unteren Teilprotoplasten allgemein; manchmal ist deren apikales Ende völlig klar, frei von Plastiden, die sämtlich hinuntergerückt sind.

1,8 Seew.: Meist deplasmolysiert, nur viele Scheitelzellen in der Kuppe noch grenzplasmolysiert, da halbkugelige Menisken den unregelmäßig konkaven Zellenkuppen noch nicht eingelegt sind. Insgesamt von den Scheitelzellen etwa die Hälfte

deplasmolysiert, die Hälfte grenzplasmolysiert. — Basale Schwärzung allgemein in den Scheitelzellen und den 2—3 nächsttieferen Zellen.

1,7 Seew.: Alles deplasmolysiert, nur in einigen Endzellen basale Anreicherung. — Bei stärkerer Vergrößerung und weit offener Blende erscheinen die dicht gelagerten Plastiden selber schwärzlich. Sie liegen aber in Profilstellung, sind schmal linsenförmig. Etwa 90—100 μ von der Basalquerswand sind die, auch noch gedrängten, Plastiden flächig gestellt und grün.

Bei Übertragung in stark hypertonisches, 2,5faches Seewasser geben die Zellen mit Basalanreicherung, hier und im Stämmchen aus 1,8 und 2,0, normale Plasmolyse mit flach konkaven Buchten auch in den unteren Ecken.

1,6 Seew.: Deplasmolysiert, nirgends Basalverlagerung.

1,5 Seew.: Keine Plasmolyse und Verlagerung.

Nach weiteren 60 Stunden am 18. April:

2,0fach Seew.: Zellen der oberen 3 Etagen noch kräftig und konvex plasmolysiert. Untere Zellen mit Grenzplasmolyse oder deplasmolysiert. In allen polare Verlagerung nach der Zellbasis. „Ob plasmolysiert oder unplasmolysiert, macht für die Reaktion nichts aus.“

1,8 Seew.: Deplasmolysiert. Fast in allen Zellen Inhalt basal verlagert. „Die Endzellen reagieren am besten, auch junge Seitensprosse besonders gut. Reaktion allgemein!“

1,7 Seew.: Zellinhalte auch größtenteils verlagert, doch Reaktion nicht so scharf und nicht so allgemein.

1,6 Seew.: Keine Basalverlagerung, nur in zwei von den Scheitelzellen Verlagerung schwach angedeutet.

1,5 Seew.: Sicher nirgends basale Verlagerung

1,4 Seew.: Keine Spur von Verlagerung. Hier wie überall alle Zellen völlig intakt.

Kontrollen in nativem 1,0 Seewasser stets ohne Verlagerung.

Revision des Hauptversuches am 23. April:

2,0fach Seew.: Prächtig intakt. Basalanreicherung erhalten. Viele Protoplasten noch plasmolysiert, andere deplasmolysiert.

1,8 Seew.: Alles lebt, deplasmolysiert. In manchen Zellen ungleiche Verteilung der Plastiden noch sehr deutlich, z. B. von der Basis 140 μ weit dicht, dann 100 μ weit minder dicht, dann locker. In anderen Stämmchen Auflockerung weiter vorgeschritten.

1,7 Seew.: Die Basalverlagerung größtenteils zurückgegangen. Zum Teil ist sie noch erhalten, dann ist aber der basale Plastidenbelag sichtlich gelockert, die Plastiden stehen auch am Zellgrund im einschichtigen Mosaik.

1,6 Seew.: Alles lebt, deplasmolysiert, keine basale Verlagerung.

In dem am 14. April direkt in 2,5fach Seew. eingetragenen Stämmchen ist jetzt in den oberen Zellagen alles tot, geschrumpft und nekrotisch geschwärzt. Weiter unten in den Stämmchen lebt ein Teil der Protoplasten, einige haben halbkugelige Rundung erlangt. Zur Basalverlagerung ist es nach der jähen Plasmolyse nirgends gekommen. — In anderen Versuchen wurde stufenweise plasmolysiert, dabei wird auch die Konzentration von 2,5 Seew. ertragen und Basalverlagerung tritt auf.

Neapel, 4. Mai 1960

Cladophora prolifera, am 3. Mai eigenhändig gesammelt. Versuch nach 1—1½ stündigem Aufenthalt der Stämmchen in den Fläschchen mit eingeeignetem Seewasser abgelesen. Witterung kühler. $T = 17^{\circ} \text{C}$.

1,9 Seew.: ++ konkave Plasmolyse.

1,8 Seew.: Überall konkave Plasmolyse.

1,7 Seew.: Im oberen Thallusteil überall Eckenplasmolyse. Tiefere Zellen der Hauptäste unplasmolysiert, aber Längswände seitlich leicht eingezogen.

1,6 Seew.: Grenzplasmolyse. Allgemein schwächste Plasmolyse, kurze seitliche Buchten. Achsenzellen unplasmolysiert.

1,55 Seew.: Keine Plasmolyse; nur 2 von den 10 Scheitelzellen im Präparat haben allerschwächste Plasmolyse.

1,5 Seew.: Keine Plasmolyse, 2 Scheitelzellen zeigen schwächste Plasmolyse.

1,45 Seew.: Nirgends Plasmolyse, auch nirgends in den Endzellen.

1,4 Seew. und 1,5 Seew.: Ebenso.

Am 3. Mai in 1,8 Seew. eingelegte Stämmchen zeigen nach 21 Stunden in den oberen 1–5 Zelletagen noch schwache Plasmolyse (gerundete Ecken der Protoplasten, dazu hie und da seitliche Buchten), weiter unten keine Plasmolyse; auch vereinzelt Endzellen deplasmolysiert, während die darunterliegenden Zellen der 2. und 3. Etage noch plasmolysiert sind. Noch keine Verlagerung.

Am Vortag in 2,0 Seew. gebrachte Stämmchen haben allgemein Plasmolyse. Endmenisken konvex z. T. halbkugelig, dazu flache, seitliche Abhebungen. Die Protoplasten liegen viel öfter an den unteren als an den oberen Zellquerwänden an; nur manche Protoplasten beiderseits frei. Noch keine Verlagerung.

Am 5. Mai (nach 54 Stunden) ist basale Anreicherung in 1,8fach, 1,9fach und 2,0fach Seew. eingetreten.

Der plasmolytische Grenzwert liegt bei *Cladophora prolifera* für die oberen Zellen bei 1,5fach, für die tieferen bei 1,6fach konz. Seewasser. Das entspricht genau dem, was Biebl (1939, S. 84) gefunden hatte. (Am 3. Mai fand ich in einer gleichen Reihe für *Cladophora utriculosa* 1,5fach und für *Cladophora corynarthra* 1,4fach Seewasser als Grenze.)

Die Schwelle der Basalverlagerung liegt also deutlich etwas höher als der anfängliche Grenzplasmolysewert. Osmotischer Wasserentzug in 1,1 bis 1,5fachen Seewasser, der nur zu Turgorverlust, aber noch nicht zu Plasmolyse führt, bleibt unwirksam. Auch die schwache Plasmolyse in 1,6fach, die nachher bald wieder zurückgeht, genügt nicht, die Inhaltsverlagerung nach der Zellbasis auszulösen.

Daß marine Grünalgen bei längerem Verweilen in eingeengtem Seewasser einen langsamen Rückgang der anfänglichen Plasmolyse zeigen, ist allgemein bekannt. Biebl hat für fünf *Cladophora*-Arten in Neapel die Deplasmolyse, d. h. die Verschiebung des plasmolytischen Grenzwertes innerhalb 24 Stunden untersucht und die Differenz bei unserer *Cl. prolifera* am kleinsten (von 1,5 auf 1,7 Seewasser) gefunden. Bei *Cl. utriculosa* war in seinen Versuchen der Grenzplasmolysewert von 1,6- auf 2,2fach und bei den Oberflächenalgen *Cl. Bertolonii* und *Cl. spinulosa* von 1,5- bzw. 1,6fach auf mehr als 3fach Seewasser hinaufgerückt.

Damit stimmen meine Beobachtungen über die Geschwindigkeit des Plasmolyserückgangs bestens überein. *Cladophora prolifera* erscheint als Tiefenalge. Über die osmotische Resistenzbreite von Oberflächen- und Tiefenalgen verdankt man Biebl (1936, 1939, 1958) ausführliche Beobachtungen. In Konzentrationsreihen verdünnten und eingeengten See-

wassers gebracht, zeigten Tiefenalgen (in Neapel, Helgoland, Plymouth und Roskoff) eine Resistenzbreite von etwa 0,5 bis 1,5 Seewasser, Algen der Ebbelinie, die ständig vom Wellenschlag erreicht werden, eine solche von 0,3 bis 2,2 Seewasser und Algen der Gezeitenzone, die zeitweise freiliegen können, eine durchschnittliche Breite von 0,1 bis über 3,0 und für *Cl. rupestris* von 0 bis 4,0 Seewasser (1958, S. 230). Mir zeigte *Cladophora prolifera* im 24 Stunden-Versuch eine Resistenzbreite von 0,1 bis 2,0, wobei also die untere Grenze den Algen der Gezeitenzone, die obere Grenze nur etwa den Cladophoren der Ebbelinie entspricht, und die Resistenzbreite immerhin weiter als bei den eigentlichen Tiefenalgen gezogen erscheint. Auch Kälte- und Wärmeresistenz von *Cl. prolifera* entsprechen nach Biebl (1939 b) übrigens der der unter der Ebbelinie lebenden Algen und sind enger gezogen als bei den während der Ebbe freiliegenden Gezeitenalgen.

In hypotonischen Lösungsreihen, gleichviel ob mit Neapeler Leitungswasser oder dest. H_2O bereitet, verblieb *Cladophora prolifera* hinab bis auf 0,15 Seewasser vollständig intakt und auch bei 0,1 lebten noch die meisten Zellen.

Der Hauptversuch wurde am 15. April eingeleitet. Das *Cladophoren*-Material, am 14. April vormittags gesammelt, war das gleiche wie in der oben mitgeteilten Reihe. Die Stämmchen waren 27 Stunden in Fläschchen mit 1 cm hoher Seewasserschicht gelegen; ans helle Licht gebracht, assimilierten solche Stämmchen lebhaft. Gleiche Sprosse eines Sträuchleins kamen in 1,0, 0,9, 0,8 ... 0,2, 0,1 Seewasser.

Am folgenden Tag lebten alle Stämmchen bis herab auf 0,2 Seew. und erschienen, bis auf die beim Auflegen des Deckglases fühlbar verstärkte Turgeszenz, unverändert. Teilstückchen ergaben in 2,0 Seew. durchwegs gute kleinbuchtige Plasmolyse.

In 0,1 Seew. waren die meisten Zellen von intaktem Aussehen, einzelne Endzellen erschienen geschädigt; in 2,0 Seew. waren die meisten gut plasmolysierbar, und nur $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{8}$ der Scheitelzellen war tot.

Nach dreitägiger Hypotonie-Behandlung brachte ich am 18. April Teilstämmchen eines großen, seit drei Tagen in 0,2 Seewasser belassenen Sträuchleins zur Bestimmung des osmotischen Wertes in die Lösungsreihe eingegengten Seewassers von 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7facher Konz. und untersuchte nach 2 Stunden:

1,7fach Seew.: Alle Zellen plasmolysiert, meist weit abgehobene flache Buchten und Konvexrundung an den Querwänden oder in den Ecken.

1,6fach Seew.: Alles ebenso, konkav plasmolysiert, nur Grad entsprechend schwächer.

1,5fach Seew.: Flach konkav plasmolysiert, doch Scheitelzellen grenzplasmolysiert oder ohne Plasmolyse.

1,4fach Seew.: Meist keine Plasmolyse, nur in 5 unter etwa 50 Zellen des Stämmchens schwache seitliche Abhebung oder Eckenplasmolyse.

1,3fach Seew.: Sicher nirgends Plasmolyse.

1,2fach Seew.: Nirgends Plasmolyse.

Die Stämmchen gehen zurück in ihre Fläschchen.

Es lag also der osmotische Wert des vorher in 0,2 Seewasser gehaltenen Materials zwischen 1,5 und 1,4 Seewasser. Der osmotische Wert war nur ganz wenig herabgesetzt.

Eine Wiederholung des Versuches vom 3.—7. Mai, wobei die *Cladophora*-Stämmchen 4 Tage in 0,2 Seewasser verweilt hatten, ergab wieder nur ein Absinken des Grenzwertes von 1,6 auf 1,35 Seewasser (überall Plasmolyse in 1,55, 1,50, 1,45, 1,40 Seewasser; in 1,3 Seewasser schwache konkave Plasmolyse in den sieben oberen, keine Plasmolyse in den weiteren Zellen).

Wäre in solchen Versuchen der osmotische Wertverlust durch Exosmose permeierfähiger Salze aus den Zellsäften in das verdünnte Seewasser zustande gekommen, so ließen sich die Daten zur Ermittlung der Salzpermeabilität auswerten. Doch soll hier auf die wichtige Frage nicht eingegangen werden, wie weit der Plasmolyserückgang im hypertonen Medium und der Wertverlust im hypotonischen bei den Meeresgrünalgen durch einfache Salzpermeation zustandekommt und wie weit die Zellen regulatorisch eingreifen, d. h. wie weit etwa Salzendosmose und -exosmose aktiv „abgestoppt“ werden. Ich will auf mein unveröffentlichtes Beobachtungsmaterial zur Frage bei anderer Gelegenheit zurückkommen. Biebl (1956) hat gelegentlich seiner zellphysiologisch-ökologischen Studien an *Enteromorpha clathrata* den Fragenkomplex diskutiert.

Doch ist in unserem Zusammenhang die folgende Beobachtung von Interesse. Im verdünnten Seewasser unterbleibt stets die Basalverlagerung; dafür rückt aber bei *Cladophora prolifera*, wenn auch später und in schwächerem Maß, das Plasma mit Plastiden in den Zellen hinauf und der Plastidenbelag wird im unteren Zellenanteil lockerer. Hypotonie bewirkt also umgekehrte Reaktion wie Hypertonie, nämlich leichte apikalwärts gerichtete Inhaltsverlagerung.

Die Reaktion war in Versuchen, die ich in früheren Jahren im Juni und Juli in Wien angestellt hatte, viel stärker hervorgetreten als in den Neapeler Versuchen von 1960. Vielleicht trägt der kühle und späte Frühling dieses Jahres zum Teil daran Schuld. Ich verzichte noch auf die Wiedergabe von Photos.

In Kürze sei noch auf die Frage eingegangen, wie sich die Basalverlagerung etwa als Teilreaktion in das Gesamtgeschehen der Regeneration und Weiterentwicklung der *prolifera*-Pflänzchen im hypertonen Medium einfügt. Ich habe der Frage — noch nicht während meines zeitlich beschränkten Neapeler Osteraufenthaltes, sondern erst nachher — ein paar orientierende, länger ausgedehnte Versuche widmen können. In alten und neuen Versuchen hat sich gezeigt, daß *Cladophora prolifera* auch bei Kultur im osmotisch abweichenden Milieu, d. i. im eingengten und im verdünnten Seewasser dauernd lebensfähig ist.

In Neapel konnte der Versuchsverlauf nur vom 14. April bis zum 7. Mai 1960 bei ungestörter Kultur beobachtet werden. Ich habe sodann reichliches *prolifera*-Material in großen Standgläsern mit reinem Seewasser mit nach Wien genommen und hier im Kühlbecken des Instituts bei geeignet gedämpftem Licht dauernd (bis Februar 1961) in gutem Zustand erhalten. Ich habe ferner etliche Versuche in den Originalfläschchen von Neapel nach Wien gebracht und weiter beobachtet. Am 17. Juli wurde dann gutes Material mit nach Bayreuth geführt und dort an einem Nordfenster bei gedämpftem Licht und gleichmäßig kühler Temperatur aufgestellt. Auch einige der Neapeler Versuche in 2,0 Seew. habe ich bis anfangs August weiter beobachtet.

Neue Versuche wurden am 3. August eingeleitet. Die *prolifera*-Stämmchen kamen in frische, durch Verdünnung aus 2,5fach Seew. hergestellte Lösungen von 1,8 und 2,0 Seew. Die Basalverlagerung stellte sich so wie früher ein. — In 1,8fach Seew. war nach 4 Tagen der Großteil der Zellen deplasmolysiert, nur 2 Scheitelzellen hatten noch schwache basale Eckenplasmolyse.

In 2,0fach Seew. waren in einem beobachteten Stämmchen 5 Zellen ohne, 4 Zellen noch mit guter Plasmolyse; bemerkenswert erschien, daß sich in einer (197' = 2760 μ langen) Zelle mit dreigeteiltem Protoplasten [0—21) + (27—102) + (103½—197)] im kleinen apikalen Stück keine Verlagerung, im mittleren Teilprotoplasten gute Basalverlagerung und im unteren eine leichte Plastidenanreicherung anstatt an der



Abb. 6.



Abb. 7.



Abb. 8.

Basis an einer mittleren flachen, nicht durchgreifenden Ringeinschnürung zeigte.

In 2,5fach Seew., worin das Material stufenweise übertragen worden war, war stärkere, normale Plasmolyse (z. B. vom Grad 0,75 in plasmometrisch meßbaren Zellen) erhalten, aber keine Basalanreicherung eingetreten.

Nach 11 Tagen, am 14. August, zeigte sich in 2,0fach Seew. fast überall infolge Anreicherung der Plastiden basale Schwärzung. Wenige Scheitelzellen waren schadhafte und zeigten die für Cladophoren wohl bekannten Erscheinungen partieller Nekrose und fraktionierter Wundheilung (vgl. Küster 1925, 1956, Weissenböck 1939, Fig. 3).

Es war z. B. die Spitze der Zellen von brauner, gelartiger Masse erfüllt (vgl. schon Brand 1901, S. 488), dann eine Zone etwa von der Breite des Fadens mit nekrotischer, schwärzlicher Masse, darunter folgte der normal grüne und lebende Plastidenbelag.

In 1,8fach Seew. war nur eine der Scheitelzellen vorne geschwärzt und nekrotisch. Mehrere andere hatten bereits vorn kurze Zellen durch neugebildete Querwände abgeschnürt (vgl. Abb. 6)¹.

Die Versuchsfläschchen blieben sodann unberührt an ihrem Nordfenster stehen bis zum 6. Oktober: In 1,8fach Seew. lebte alle *Cladophora prolifera*. Die Scheitelzellen hatten jetzt vielfach kurze Endzellen abgegliedert und oft waren die unteren Zellen zu seitlichen Fäden ausgewachsen. — Das Versuchsfläschchen wurde am 7. Oktober zurück nach Wien gebracht und weiter bis zu Anfang Dezember im Kühlbecken belassen. Am 2. Dezember, also vier Monate nach Versuchsbeginn, hat dann Dozent Dr. Url zusammen mit mir noch einige



Abb. 9.

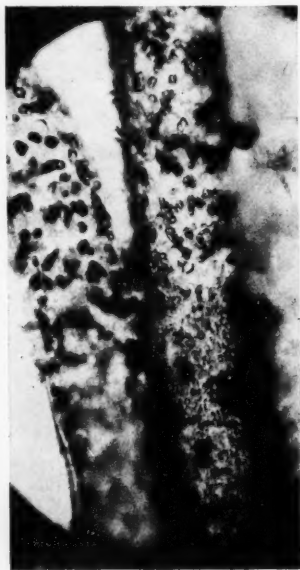


Abb. 10.

Photos aufgenommen. Abb. 6 zeigt ein Beispiel abgeschnürter Endzellen. Die Basalanreicherung ist in manchen Zellen erhalten.

Äste vom gleichen Sträuchlein, die ebenso lange in 2,0fach Seew. verweilt hatten, zeigten zwar keine Zellteilung, dafür hatte sich aber in mehreren Zellen die basale Verlagerung erhalten, ja in einigen war am chloroplastenarmen Apikale noch schwache Plasmolyse zu sehen, wobei die glatt halbkugelige Rundung der Protoplastenmenisken erkennen ließ, daß die Zellen lebten. Das Bild einer solchen Zelle ist in Abb. 7 und 8 wiedergegeben.

Nach solchen orientierenden Beobachtungen stellt sich das Restitutionsgeschehen bei *Cladophora prolifera* etwa folgendermaßen dar.

¹ Küster (1952, S. 471) hat ähnliche inäquale Zellteilungen an *Chaetomorpha aerea* — gleichfalls in Binnenlandkultur — beobachtet, wobei die apikale Zelle stets die kleinere wurde und das Längenverhältnis der Schwesterzellen bis auf 1 : 5 sank.

Zuerst rückt wie beschrieben der Hauptteil der Masse des Binnenplasmas mit Einschluß der Plastiden nach der Zellenbasis, wo sich diese bei stark reagierendem Material zu einer schwärzlich undurchsichtigen Masse anhäufen. Später erfolgt eine Lockerung der zuvor dicht gedrängten Chloroplasten und diese rücken nun ringsum bis zu gewisser Höhe an den Längsseiten der Zelle empor (vgl. Abb. 9 und 10, mittlerer Faden); bei ungestörtem Verlauf wird wohl auch die ursprüngliche Verteilung der Plastiden nahezu wieder erreicht.

Recht oft wird sodann später, zumal in den Scheitelzellen und ihren Nachbarn, am apikalen Ende eine abnorm kurze Zelle durch sukzedane Querwandbildung abgegliedert (während ja bei der Zellteilung im normalen Seewasser zwei ähnlich lange Tochterzellen aus der Mutterzelle hervorgehen²). Es handelt sich um osmotisch induzierte inäquale Zellteilungen. Die größeren, inhaltsreich gebliebenen basalen Zellen wachsen nachher zu seitlichen Sprossen aus.

Ein solcher Reaktionsverlauf wird indes im stark hypertonischen Seewasser an verschiedenen Punkten unterbrochen oder gehemmt. Es finden sich daher nach langer Versuchsdauer vereinzelt oder zahlreicher Stadien, die sozusagen steckengeblieben sind, restliche basale Inhaltshäufungen usw., in welchen das Plasma und die Chloroplasten mehr minder pathologische Charaktere aufweisen.

VII. Vergleich mit anderen marinen *Cladophoren*

Wie Bünning (1957) ausführt, ist stabile, „inhärente“ Polarität im wesentlichen aus den Studien von Regenerationsvorgängen erschlossen worden.

Auf *Cladophora* bezieht sich Miehes (1905) klassischer Versuch, die Polarität der Einzelzelle nachzuweisen. Er hat in Neapel eine *Cladophora* sp. behutsam — unter langsamem, tropfenweisem Zufluß konzentrierter NaCl-Lösung zum natürlichen Seewasser — plasmolysiert und, nachdem die Protoplasten konvex gerundet und durch Abhebung von den Querwänden physiologisch isoliert waren, die Plasmolyse durch langsamen Zufluß von Seewasser und folgende Rückübertragung in einfaches Seewasser wieder zum Rückgang gebracht. Auf solche Weise war die plasmatische Verbindung der Nachbarzellen aufgehoben. Es stellte sich dann bald an jeder Zellbasis Wachstum ein, das zur Ausbildung blasser, rhizoidartiger Gebilde führte; viel später schollen auch die apikalen Zellenden an; sie wurden dunkelgrün und entwickelten aufrecht wachsende Äste. „Der in seine Elemente zerlegte Algenkörper war also jetzt zu einem Haufen von Einzelpflänzchen geworden, von denen im typischen Fall immer eines auf dem anderen sitzt.“ Bei solcher Restitution haben die Einzelzellen die

² Nach Berthold (zit. nach Oltmanns 1922, Bd. 1, S. 348) ist das Scheitelwachstum der *Cladophoren* bei den verschiedenen Arten nicht gleichmäßig scharf ausgeprägt und am schärfsten bei *Cladophora prolifera*. Berthold fand da in den Segmenten kaum noch Teilungen, so daß fast die ganze Verlängerung der Äste auf Rechnung der Scheitelzellen kommt.

Polarität der ganzen Pflanze beibehalten. Die „Integralpolarität“ (Zimmermann 1929), welche dem ganzen Organ oder Organismus zukommt, findet sich als „Differenzialpolarität“ am Einzelprotoplasten wieder. Czaja (1930) hat später die Methode der physiologischen Isolierung auf die Süßwasserart *Cladophora glomerata* übertragen und hier, nach operativer Isolierung, gleichfalls die Polarität der Zellen nachweisen können.

Miehes Ergebnisse haben in alle Lehrbücher der allgemeinen Botanik Aufnahme gefunden. Er und seine Nachfolger (Czaja 1930, Leib 1935) hätten basale Verlagerungen des Zellinhaltes, wie sie im vorstehenden beschrieben wurden, sicher erwähnt, wenn sie ihnen begegnet wären. Stehen also meine Beobachtungen zu denen meiner Vorgänger, die mit *Cladophora* arbeiteten, in Widerspruch?

Miehe hat leider seine Versuchsalge in Neapel nicht bestimmt. Er spricht von *Cladophora* sp., und von *Cladophora* ohne Angabe der Spezies ist überall im Schrifttum, wo er zitiert wird, die Rede (Jost 1913, S. 440, Küster 1925, S. 410, Bünnig 1953, 1957, S. 3, Troll 1959, S. 668).

Ich glaube nun, sagen zu können, daß Miehes Versuchspflanze *Cladophora utriculosa* Kütz. war.

Miehe (1905, S. 258) hatte schon 1903 „eine marine *Cladophora*-Art gefunden, die im Golf von Neapel sehr gemein ist und in Form von ziemlich rigiden Polstern überall an Steinen festsitzt“. — Ich habe mit *Cl. utriculosa*, dieser sehr resistenten Art, schon 1930 sowohl in Neapel wie in Plymouth (vgl. Höfler 1932) und später mehrfach wieder gearbeitet. Zehetner (1934) hat *Cladophora utriculosa* aus Santorin am Wiener Institut in einer größeren Versuchsreihe verwendet. In Neapel habe ich dann 1960 in den Hauptversuchen gleichlaufend mit *Cl. prolifera* auch *Cl. utriculosa* beobachtet. Die Plasmolyse wird hier relativ bald, indem sich die Protoplasten von den Querwänden lösen, konvex und geht dann langsam aber deutlich rascher als bei *prolifera* zurück. Wurden die Stämmchen sodann in den hypertonen Lösungen belassen, so erfolgte überall Dunkelgrünfärbung und meist keulenförmige Anschwellung seitlich oben an den apikalen Zellenpolen, die sich anschickten auszuwachsen. Die Reaktion erscheint also fast umgekehrt zu verlaufen wie bei *prolifera*. Ähnliche seitlich-apikale Plastidenanreicherung sah ich übrigens oft an *Cl. utriculosa* auch schon ohne osmotische Impulse am frühlinghaft austreibenden Material. Eine auch nur vorübergehende Basalverschiebung der Zellinhalte wäre mir nicht entgangen.

Andere *Cladophoren* habe ich seit 1955 bei mehreren Küstenaufenthalten auf Verlagerungsreaktionen geprüft. Ich setzte die Algen in hypertonisch eingeeignetes (meist 2faches) Seewasser, konnte aber nirgends die mir von *Cl. prolifera* bekannte polare Basalverlagerung wiederfinden. Die Beobachtungen beziehen sich u. a. auf *Cladophora refracta* Kütz. (vgl. Luise Höfler 1962), *Cl. pumila* Kütz., *Cl. corynarthra* Kütz. und *Cl. repens* (Fag.) Harv. aus Neapel, auf *Cladophora pumila* aus Elba (vgl. Höfler 1956), *Cl. Ruchingeri* Kütz. aus Venedig, auf eine unbestimmte *Cladophora* von der Küste der Zykladeninsel Mykonos, die wohl dem Verwandtschaftskreis von *Cl. crystallina* angehört, und auf einige *Cladophoren* von Pereia im

Golf von Thessalonike, die ich 1958 frisch in Herrn Koll. Diannelidis Laboratorium in 2,0- und 1,8fach Seewasser untersuchen konnte.

Ich kann all diese Beobachtungen dahin zusammenfassen, daß sich bisher nur an *Cladophora prolifera*, hier aber regelmäßig, die osmotisch ausgelöste polare Massenverlagerung nach der Zellbasis hat nachweisen lassen. Es zeigt sich auch darin, wie ganz verschieden die cönocytischen Protoplasten der einzelnen *Cladophora*-Arten zellphysiologisch reagieren und wie verfehlt es wäre, die an einer Art festgestellten Reaktionen auf die ganze Gattung übertragen zu wollen.

Nur an Süßwasser-*Cladophoren* aus der *fracta*-Gruppe hat Schoser (1956) in seiner eindringenden cytologischen Studie basale Plasma- und Chondriosomenhäufungen während der Regeneration festgestellt, und zwar durch Dichtemessungen am lebenden und fixierten Protoplasten. Orientierende Beobachtungen aus dem Wiener Institut von Moser (1942) an der euryhalinen *Cl. fracta* hatten in gleicher Richtung gewiesen.

Während der polare Charakter der Zellen, der sich in den Regenerationsvorgängen kundgibt, wohl allen in der Großgattung *Cladophora* vereinigten Siphonocladialen zukommt, sind also osmotisch auslösbare polare Inhaltsverlagerungen bisher nur an *Cl. prolifera* (und *Cl. fracta*) beobachtet. —

Die theoretische Interpretation der Zellpolarität (vgl. Bünnig 1957 und die dort zitierte Lit.) rechnet heute mit zwei Hauptfaktoren, mit chemisch-stofflichen Verschiedenheiten zwischen apikalem und basalem Pol bzw. chemischen Gradienten und mit polaren Plasmadifferenzen.

Bünnig tritt für die Bedeutung der plasmatischen Polarität ein und er verweist auf Vöchting (1918), der das Wesen der Polarität in der inneren Struktur des Protoplasmas sah.

Die beschriebenen polaren Verlagerungen der lebenden Zellinhalte als sichtbare Wirkung osmotischer Impulse stellen wohl die primäre Rolle des Plasmas besonders deutlich ins Licht.

Für die gastliche Aufnahme in Neapel sei dem Direktor der Stazione Zoologica Herrn Dr. Peter Dohrn auch an dieser Stelle herzlichster Dank gesagt.

Literatur

- Berthold, G., 1882: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Meeresalgen. Jb. wiss. Bot. 13, 569.
- Biebl, R., 1958: Trockenresistenz und osmotische Empfindlichkeit der Meeresalgen verschieden tiefer Standorte. Jb. wiss. Bot. 56, 530.
- 1959: Protoplasmatische Ökologie der Meeresalgen. Ber. dtsh. bot. Ges. 57, 78.
- 1959 b: Über die Temperaturreistenz von Meeresalgen verschiedener Klimazonen und verschieden tiefer Standorte. Jb. wiss. Bot. 88, 389.
- 1952: Ecological and non-environmental constitutional resistance of the protoplasm of marine algae. Journ. marine biol. assoc. of United Kingdom 31, 307.
- 1956: Zellphysiologisch-ökologische Untersuchungen an *Enteromorpha clathrata* (Roth) Greville. Ber. dtsh. bot. Ges. 69, 75.
- 1958: Temperatur- und osmotische Resistenz von Meeresalgen der bretonischen Küste. Protoplasma 50, 217.

- Brand, F., 1901: Über einige Verhältnisse des Baues und Wachstums von *Cladophora*. Beih. Botan. Cbl. 10, 481.
- Bü n n i n g, E., 1953: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin.
- 1957: Polarität und inäquale Teilung des pflanzlichen Protoplasten. Protoplasmatologia VIII/9 a. Springer-Verlag Wien.
- C z a j a, A. Th., 1930: Zellphysiologische Untersuchungen an *Cladophora glomerata*. Isolierung, Regeneration und Polarität. Protoplasma 11, 601.
- Diannelidis, Th., 1950: Περὶ τῆς Ἑλληνικῆς θαλάσσιας χλωρίδος καὶ τῆς χρησιμοποιοῦσας αὐτῆς Athen.
- Funk, G., 1927: Die Algenvegetation des Golfs von Neapel. Pubbl. Stazione Zoologica di Napoli. Vol. VII, Supplemento.
- 1955: Beiträge zur Kenntnis der Meeresalgen von Neapel. Zugleich mikroskopischer Atlas, Ebenda Vol. XXV, Supplemento.
- Germ, H., 1932/33: Untersuchungen über die systrophische Inhaltsverlagerung in Pflanzenzellen nach Plasmolyse. I—III. Protoplasma 14, 566; 17, 509, 18, 260.
- Höfler, K., 1932: Plasmolyseformen bei *Chaetomorpha* und *Cladophora*. Protoplasma 16, 189.
- 1956: Zellphysiologische Studien an Meeresalgen. Ber. dtsch. bot. Ges. 69, 301.
- Höfler, L., 1962: Osmotische Resistenz der Zoosporen einiger mariner Cladophoren. Protoplasma, in Vorbereitung.
- Jost, L., 1913: Vorlesungen über Pflanzenphysiologie. G. Fischer, Jena.
- Küster, E., 1910: Über Inhaltsverlagerungen in plasmolysierten Zellen. Flora 100, 267.
- 1924: Experimentelle Physiologie der Pflanzenzelle. Abderhalden Handb. biol. Arbeitsmeth. XII/1/7, 961.
- 1925: Pathologische Pflanzenanatomie, 3. Aufl. G. Fischer, Jena.
- 1952: Zytomorphologische Beobachtungen an *Chaetomorpha*. Protoplasma 41, 467.
- 1956: Die Pflanzenzelle, 3. Aufl. VEB G. Fischer, Jena.
- Leib, E., 1935: Zur Physiologie und Pathologie der *Cladophora*-Zelle. Wiss. Meeresunters. Helgoland, N. F. 19, Nr. 8, 1.
- Miehe, H., 1905: Wachstum, Regeneration und Polarität isolierter Zellen. Ber. dtsch. bot. Ges. 23, 257.
- Moser, L., 1942: Zellphysiologische Untersuchungen an *Cladophora fracta*. Österr. bot. Z. 91, 132.
- Oltmanns, F., 1922/23: Morphologie und Biologie der Algen. Band I—III. G. Fischer, Jena.
- Schoser, G., 1956: Über die Regeneration bei den Cladophoraceen. Protoplasma 47, 103.
- Troll, W., 1959: Allgemeine Botanik, 3. Aufl. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- Vöchting, H., 1918: Untersuchungen zur experimentellen Anatomie und Pathologie des Pflanzenkörpers II. Die Polarität der Gewächse. Tübingen.
- Weißböck, K., 1939: Membranregeneration plasmolysierter *Vaucheria*-Protoplasten. Protoplasma 32, 44.
- Zehetner, H., 1934: Untersuchungen über die Alkoholpermeabilität des Protoplasmas. Jb. wiss. Bot. 80, 505.
- Zimmermann, W., 1929: Experimente zur Polarität von *Caulerpa* und zum allgemeinen Polaritätsproblem. Roux' Archiv 116, 669.

Über den Bau des Vakuolensystems einiger *Cladophora*-Arten

Von

Alfred Diskus¹

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. März 1961)

Wie bekannt, ist der Zellsafttraum von *Cladophora* durch Plasmalamellen in eine große Zahl von Teilvakuolen gegliedert. An der Peripherie dieses aus Wabenvakuolen zusammengesetzten Zylinders findet man die Hauptmasse des Protoplasmas mit dem Chromatophor und den Zellkernen. Die Teilvakuolen von *Cladophora fracta* und *Cladophora glomerata* enthalten einen Zellsaft, der sich bei Färbung mit verschiedenen basischen Vitalfarbstoffen gelartig verfestigt und sich dabei kontrahiert. Die kontrahierten, polyedrischen Vakuoleninhalte finden sich nach Färbung mit Neutralrot sowohl in den peripheren als auch in den tiefer gelegenen Partien des „stabilen Plasmaschaumes“. Gicklhorn und Möschl (1930) haben den Färbevorgang und die Kontraktion der Wabeninhalte als erste, und zwar an *Cladophora glomerata*, beschrieben. Ganz ähnlich wie *Cladophora glomerata* verhält sich auch *Cladophora fracta* (Moser 1942).

Die hier mitgeteilten Untersuchungen an einigen marinen *Cladophora*-Arten sollen darlegen, daß ein Vakuolensystem in dieser Art nicht allen Vertretern der Gattung *Cladophora* eigen ist. Erste Ergebnisse sind bereits bei Höfler (1956) mitgeteilt worden. Für die ersten Versuche standen *Cladophora utriculosa* und *Cladophora prolifera* zur Verfügung. Diese beiden Formen sind prinzipiell gleich gebaut wie die Süßwasserarten *Cladophora fracta* und *Cl. glomerata*. Der Zellsafttraum ist gleichfalls in Teilvakuolen gegliedert.

Werden Stämmchen von *Cladophora utriculosa* und *Cladophora prolifera* 10 Minuten lang in eine Lösung von Neutralrot 1 : 5000 in Seewasser eingelegt, so treten mit großer Regelmäßigkeit in fast allen Zellen die kontrahierten, stark rot gefärbten Wabenvakuolen in Erscheinung. Die Waben-

¹ Jetzt: Biologische Forschungsabteilung der Österr. Stickstoffwerke AG., Linz.

vakuolen enthalten demnach wie jene von *Cl. fracta* und *Cl. glomerata* einen stark speicherfähigen, bei Vitalfärbung sich gelartig verfestigenden Zellsaft.

Mit *Cladophora pumila* (Abb. 1), einer Art, die Prof. K. Höfler anlässlich eines Aufenthaltes an der Südküste von Elba gesammelt hatte, wurden gleichfalls Färberversuche mit Neutralrot und einigen weiteren Vitalfarbstoffen wie Brillantcresylblau und Rhodamin B, ferner mit den Fluorochromen Acridinorange und Uranin angestellt. An *Cladophora pumila*

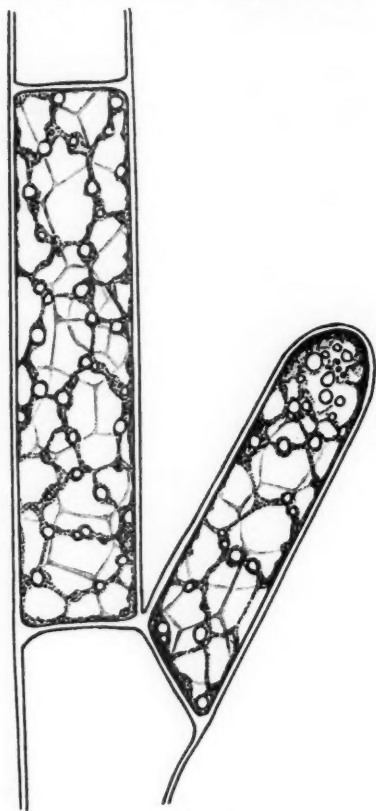


Abb. 1.

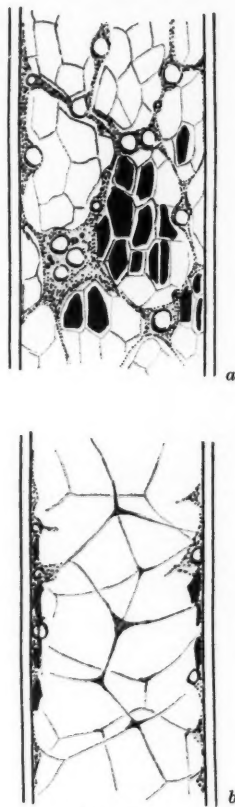


Abb. 2.

Abb. 1. *Cladophora pumila* mit peripherem, netzförmigem Chromatophor; der zentrale Zellsafricaum ist von einem großmaschigen Plasmawabenwerk erfüllt.

Abb. 2 a. *Cladophora pumila*. Nach Färbung mit Neutralrot 1 : 5000, in Seewasser gelöst, werden die gefärbten und kontrahierten Inhaltskörper der peripheren Grenzschichtvakuolen sichtbar. b. *Cladophora pumila*. Neutralrotfärbung. Bei tiefer Einstellung wird das zentrale Plasmanetz sichtbar. An der Peripherie liegen die gelartig verfestigten und gefärbten Grenzschichtvakuolen.

treten nach Färbung mit Neutralrot in Seewasser (Verdünnung 1:5000) die schon bekannten polyedrisch kontrahierten Inhalte der Teilvakuolen in allen Zellen auf. Allerdings sind bei dieser Art die Teilvakuolen, welche kontrahierbaren, speicherstoffführenden Zellsaft besitzen, auf die Peripherie der Zelle beschränkt (Abb. 2a). Die tiefer liegenden, bedeutend größeren Plasmawaben bleiben nach Färbung mit Neutralrot entweder ungefärbt oder es kommt zu einer schwachen Krümelspeicherung, bisweilen auch zu einer schwachen Diffusfärbung (Abb. 2b). Analoge Färbilder erhält man nach Behandlung der Zellen mit Brillanteresylblau 1:10000, in Seewasser gelöst. Rhodamin B ist weniger gut zur Färbung dieser Grenzschichtvakuolen geeignet. Nach ½stündigem Aufenthalt der Zellen im Farbbad zeigten sich die ersten Ansätze einer Färbung und Kontraktion der peripheren Plasmawaben. Die tiefer gelegenen zentralen Kammern blieben bei Rhodaminbehandlung stets ungefärbt. Der Inhalt der Grenzschichtvakuolen speichert Vitalfarbstoffe wie Neutralrot und Brillanteresylblau sehr intensiv. Gegenüber dem von Speicherstoffen offenbar freien zentralen Wabenvakuom besteht somit eine starke Speicherkonkurrenz.

Eine Behandlung von *Cladophora pumila* mit Lösungen von Acridinorange 1:5000, in Seewasser gelöst, bewirkt an den peripheren Grenzschichtvakuolen gleichfalls eine Färbung und Verfestigung des Vakuoleninhaltes. Im Hellfeld erscheinen die kontrahierten Inhaltskörperchen hell bis kräftig braungelb, im UV-Licht strahlen sie rot. Daß es sich bei den peripheren Plasmawaben dennoch um Räume mit einem „vollen“ Zellsaft handelt, zeigen Entfärbversuche mit CaCl_2 -Lösungen und mit Ammoniak. Das vom Vakuoleninhalt gespeicherte Neutralrot ist weder durch CaCl_2 noch durch $n/10$ normale Ammoniaklösung zu entfernen. Die Zugabe von $n/50$ Ammoniak bewirkt vielmehr, daß bei Gegenwart von Neutralrot die Kontraktion und Farbspeicherung besonders rasch und kräftig erfolgt. Die Bindung des Neutralrot an den sich verfestigenden Vakuoleninhalt ist gewiß chemischer Natur, wenngleich die rote Fluoreszenz der mit Acridinorange tingierten Inhaltskörper vorerst eine elektroadsorptive Bindung anzudeuten scheint. Ein Ionenfallenmechanismus ist mit Sicherheit auszuschließen. Rhodamin B, welches die Grenzschichtvakuolen ebenfalls anzu färben imstande ist, ist beim pH des Seewassers nicht dissoziiert und kann schon aus diesem Grunde keinen Ionenfalleneffekt liefern.

Recht aufschlußreich waren Zentrifugierungsversuche. Moser (1942) zentrifugierte *Cladophora fracta* 15 Minuten lang bei 2500 Touren und stellte fest, daß sich der „stabile Plasmaschaum“ nicht verlagern läßt. Gleiches haben bereits Gicklhorn und Möschl (1930) nach Schleuderung von *Cladophora glomerata*-Zellen gefunden. Derartig stabile Plasmastrukturen sind indes auch bei Desmidiaceen zu finden. Kiermayer (1954) konnte unter anderem an *Micrasterias rotata*, *M. denticulata*, *M. americana*, *M. apiculata*, *M. truncata*, an *Tetmemorus granulatus* und besonders regelmäßig an *Pleurotaenium truncatum* und *Spirotaenia conden-*

sata ein relativ stabiles Plasmawabenwerk im zentralen Zellsaftraum nachweisen. Gleich dem „stabilen Plasmaschaum“ der Cladophoren ist auch das Plasmawabenwerk der Desmidiaceen durch die bei schonender Zentrifugierung auftretende Massenbeschleunigung nicht verlagerbar, wenngleich die bedeutend massigeren Chromatophoren der Desmidiaceen während der

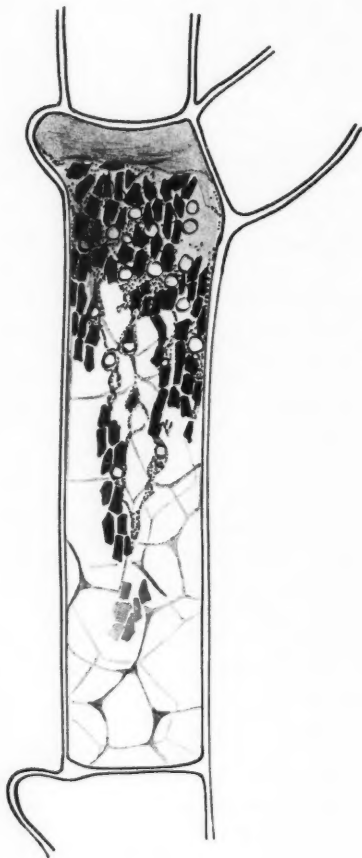


Abb. 5.

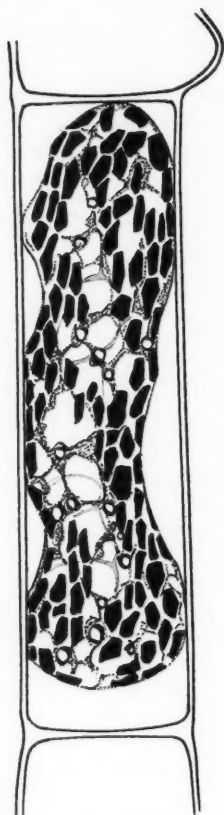


Abb. 4.

Abb. 5. *Cladophora pumila* nach Zentrifugierung und anschließender Färbung mit Neutralrot 1:5000, in Seewasser gelöst. Zentrifugal die Masse des Zytoplasmas, anschließend daran der Chromatophor mit den Grenzschichtvakuolen. Die Inhalte dieser Waben sind rot gefärbt und kontrahiert. Das zentrale Plasmareiz blieb unverlagert.

Abb. 4. Mit Neutralrot gefärbte Zelle von *Cladophora pumila*, anschließend in 1,0 mol Traubenzucker plasmolysiert.

Verlagerung das zarte Plasmanetz bisweilen zerreißen können (Kiermayer 1954, 216).

Bei allen bisher beobachteten Fällen von stabilen Plasmawaben handelt es sich um mikrosomenfreies, bei Beobachtung mit den üblichen optischen Hilfsmitteln als hyalin zu bezeichnendes Plasma. Auch Plasmaströmung wurde bislang an solchen stabilen Plasmastrukturen nicht beschrieben. Dies trifft auch für das von Molisch (1917) beschriebene Plasmamosaik der Raphidenzellen von *Haemaria discolor* zu, vgl. Diskus u. Kiermayer (1954). Moser fand nach Zentrifugierung von *Cladophora fracta* die Chloroplasten stets am äußersten zentrifugalen Ende der Zellen, während die Wabenvakuolen sich nicht verlagerten. Nach Zusatz von Neutralrot zu solcherart vorbehandelten Zellen erscheinen die kontrahierten Teilvakuolen vorerst am zentripetalen Ende der geschleuderten Zelle. Jedenfalls sei festgehalten, daß bei *Cladophora fracta* die kontrahierbaren Vakuoleninhalte sich nicht verlagern können, da es sich um den Inhalt des auch bei Schleuderung „stabilen“ Plasmanetzes handelt. Die periphere Plasmaschicht mit den Chromatophoren ist auf dem darunterliegenden stabilen Plasmaschaum leicht verschiebbar.

Ich habe in ähnlicher Weise Zentrifugierungsversuche mit *Cladophora pumila* durchgeführt. Ein Stämmchen wurde zwischen die Hälften eines Korken eingeklemmt und dieser auf das Zentrifugenröhrchen aufgesetzt, so daß die Ästchen mit den Spitzen nach unten im Zentrifugenröhrchen hingen. Dadurch sollte eine Verlagerung des Zellinhaltes möglichst in der Längsrichtung der Zellen erreicht werden. Nach ½stündigem Schleudern bei 2500 Touren hatte sich in fast allen Zellen die Hauptmasse des Protoplasmas, die Chromatophoren und — wie nach Zusatz von Neutralrot ersichtlich — auch die Masse der Grenzschichtvakuolen zentrifugal verlagert. Das zentrale Plasmanetz war nicht verlagert (Abb. 3). Es zeigt sich somit am Vakuum von *Cladophora pumila* eine Differenzierung in zwei Schichten. Peripher, etwa in gleicher Ebene wie die Chloroplasten, findet sich eine Schicht von kleinen Plasmawaben, die den auch bei anderen *Cladophora*-Arten festgestellten kontrahierbaren und stark färbbaren Zellsaft enthalten. Diese „Grenzschichtvakuolen“ sind aber, zum Unterschied vom „stabilen Plasmaschaum“ anderer Cladophoren, gemeinsam mit dem Zytoplasma und den Chromatophoren durch Zentrifugierung verlagerbar. An das periphere System der Grenzschichtvakuolen schließt nach innen ein zentraler, in Waben gegliederter Hohlzylinder an. Dieses Vakuolensystem enthält keinen speicherfähigen, sich gelartig verfestigenden Zellsaft. Die Waben sind lediglich schwach tingierbar. Bei Zentrifugierung verhält sich dieses zentrale Plasmanetz gleich dem „stabilen Plasmaschaum“ von *Cladophora fracta* oder *Cladophora glomerata*.

Nach Färbung der geschleuderten Zellen von *Cladophora pumila* mit Uranin 1 : 10 000, in Seewasser gelöst und auf pH 4,8 gepuffert, leuchten im UV-Licht die Pyrenoide, wie gewohnt, gleißend grün, ebenso die am äußersten zentrifugalen Ende befindliche Plasmamasse. Die Plasmalamellen des zentralen Plasmanetzes fluoreszieren zufolge der Zartheit und der geringen Schichtdicke nur schwach grünlich. Die peripheren Grenzschichtvakuolen

waren mit Uranin nicht nachzuweisen. Offenbar besitzt deren Inhalt kein Speichervermögen für Uranin.

Zur Frage, ob die Kontraktion der Grenzschichtvakuolen bei Färbung mit Neutralrot ein vitaler oder prämortaler Effekt ist, wurden Versuche mit frisch gesammelter *Cladophora fracta* durchgeführt. Nach Vitalfärbung mit Neutralrot färben sich die den Grenzschichtvakuolen analogen Plasmawabeninhalte gleichfalls regelmäßig an. Die Färbung und Kontraktion des Zellsaftes ist vor allem in den Endzellen zu beobachten, wogegen ältere Zellen vielfach nur Krümmelspeicherung erkennen ließen. Wie auch Moser (1942) feststellt, ist die Kontraktion und Färbung des Inhaltes der Wabenvakuolen ein irreversibler Vorgang. Im unbehandelten Zustand ist in den Wabenvakuolen kein fester Zellsaft zu erkennen und wahrscheinlich auch nicht vorhanden. Der Zellsaft färbt und verfestigt sich erst bei Zusatz von Neutralrot oder Brillancresylblau. Der Vorgang verändert den Lebenszustand der Zelle gewiß nicht. Zellen mit solcherart ausgefärbten und kontrahierten Grenzschichtvakuolen sind mit 1,0 mol Traubenzuckerlösung normal plasmolysierbar (Abb. 4). Sicherlich ist die Kontraktion und Färbung der Wabenvakuolen ein irreversibler, jedoch bei unveränderter Vitalität vor sich gehender Vorgang, vergleichbar etwa der Gerbstofffällung in *Spirogyra*-Zellen durch Zusatz von Coffein.

Zusammenfassung

Der Zellsaftraum von *Cladophora utriculosa* und *Cl. prolifera* ist wie der von *Cl. fracta* und *Cl. glomerata* durch Plasmalamellen vakuolig zerteilt. Diese Vakuolen bilden ein stabiles Plasmanetz. Der Inhalt dieser Teilvakuolen speichert basische Vitalfarbstoffe wie Neutralrot und Brillancresylblau und kontrahiert sich dabei zu polyedrischen, gelartig verfestigten Gebilden. Das Plasmawabenwerk von *Cladophora pumila* ist dagegen in zwei Schichten gegliedert. Lediglich das periphere, in Höhe der Plastiden gelegene Plasmanetz enthält jenen Zellsaft, der sich bei Zusatz von Neutralrot färbt und kontrahiert. Das zentrale Vakuum wird von einem an Speicherstoffen armen Plasmawabensystem gebildet. Dieses verhält sich bei Zentrifugierung so wie der „stabile Plasmaschaum“ der *Cladophora fracta* oder *Cladophora glomerata*.

Literatur

- Diskus, A., und O. Kiermayer, 1954: Die Raphidenzellen von *Haemaria discolor* bei Vitalfärbung. *Protoplasma* 43, 450.
 Gicklhorn, J., und W. Möschl, 1930: Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion an Zellen mit stabilem Plasmaschaum. *Protoplasma* 9, 521.
 Höfler, K., 1956: Zellphysiologische Studien an Meeresalgen. *Berichte d. dtsh. bot. Ges.* 69, 301.
 Kiermayer, O., 1954: Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbung und Zentrifugierungsversuchen. *S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl.* Abt. I, 163, 175.
 Molisch, H., 1917: Das Plasmamosaik in den Raphidenzellen der Orchideen *Haemaria* und *Anoectochilus*. *S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl.* 126, 231.
 Moser, L., 1942: Zellphysiologische Untersuchungen an *Cladophora fracta*. *Österr. bot. Z.* 91, 131.

Eiweißkörper in *Neomonospora furcellata*

Von

Irmtraud Thaler

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. März 1961)

Eiweißkristalle und -spindeln in Cormophyten wurden schon oft beschrieben. Bei vielen Pflanzen, wie *Nicotiana* (vgl. Bawden 1956), einigen Cactaceen (Weber und Kenda 1952, a, b), *Alliaria* (Miličič 1956) treten diese Eiweißgebilde meist in der Epidermis und Subepidermis auf, wenn der Stoffwechsel der Pflanze durch Virusinfektion modifiziert wurde, bei anderen Pflanzen wiederum wie z. B. bei *Valerianella* (Thaler 1954) stellen sie ein Artmerkmal dar.

In Algen wurden Eiweißkristalle zum ersten Mal von Cramer 1861 in *Bornetia secundiflora*, die in Kochsalz- oder Weingeistlösung aufbewahrt wurde, gesehen. Cohn 1867 hat sie bei derselben Pflanze in lebenden Zellen beobachtet. Die ausführlichste Arbeit über die Verbreitung der Eiweißkristalle in Meeresalgen stammt von Klein 1882. Er untersuchte vor allem Herbarmaterial, in dem sich die Eiweißkristalle gut erhalten haben. Wakker 1888, Berthold 1886, Küster 1899, Ernst 1904 berichten über die Eiweißgebilde in *Codium* und *Derbesia*, Chemin 1931 über die in *Cladophora*. Molisch 1926 beschreibt Eiweißspindeln und cytoplasmatische Einschlüsse in einer *Vaucheria*-Art. Bei einigen Ceramiaceen wurden sie zum ersten Mal von Dammann 1932 beobachtet. In der Monographie der Ceramiaceen von Feldmann-Mazoyer 1940 werden die Eiweißkristalle in einem eigenen Kapitel behandelt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage: Sind die Eiweißkristalle der Algen auch mit einer Virusinfektion in Zusammenhang zu bringen oder handelt es sich bei ihnen um Reservestoffe?

Während eines vierwöchigen Aufenthaltes in der Zoologischen Station in Neapel habe ich mehrere Algenarten auf das Vorkommen von Eiweißkristallen untersucht, wobei mir eine Ceramiaceae, *Neomonospora fur-*

*cellata*¹ wegen ihrer unberindeten Zellen als günstiges Versuchsobjekt erschien. Es stand mir diese Rotalge aus dem Hafengebiet (den Buchten am Posillipo und längs der Via Caracciolo) zur Verfügung; sie kommt dort epiphytisch auf verschiedenen anderen Algen vor.

In den mehrkernigen Zellen von *N. furcellata* (übrigens auch in *N. pedicellata*) findet man, mehr oder weniger stark von Plastiden verdeckt, die Eiweißkristalle. Sie wurden bei *N. furcellata* zum ersten Mal von Feldmann-Mazoyer et Meslin 1939: 30 wie folgt beschrieben: „On trouve également... de beaux cristalloïdes protéiques de forme losangique à angles tronqués, de $7 \times 12 \mu$, ou de forme plus ou moins pentagonale ou hexagonale et de plus petite taille: $4 \times 7 \mu$.“ Sie zeigen oft auch unregelmäßige Formen und liegen häufig zu mehreren beisammen.

In älteren Zellen sind oft bis zu 100 solcher Kristalle verschiedener Größe zu finden.

Außer diesen schon bekannten hexagonalen oder kubischen Kristallen konnte ich in den tetrasporangientragenden *Neomonospora*-Pflanzen auch Einschlüsse anderer Art beobachten. Es sind dies Spindeln und Stäbe, die aus mehreren parallelen Fibrillen bestehen und dadurch längsgestreift aussehen; ihre Enden sind schräg abgeplattet (Abb. 1). Diese Einschlüsse sind nur vereinzelt anzutreffen und finden sich jeweils, soweit ich beobachten konnte, vorwiegend in den jüngeren Zellen des Thallus. Im lebenden Zu-

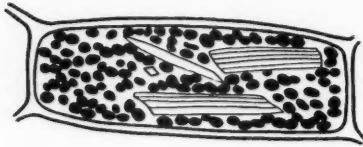


Abb. 1. Zelle mit Plastiden und Eiweiß-einschlusskörpern.

stand ist wegen der großen Anzahl der eng aneinanderliegenden Plastiden eine Beobachtung äußerst schwierig. Daher wurde auch mit Pfeifferschem Gemisch fixiertes Material untersucht. Die Spindeln bleiben nach dieser Fixierung zum Großteil erhalten, erscheinen nur etwas schraubig verdreht.

Im sauren Bereich färben sich die hexagonalen Kristalle wie die Spindeln mit Fuchsin stark an, im alkalischen sind die Kristalle nur schwach rosa, die Spindeln erscheinen ungefärbt. Umgekehrt sind mit dem basischen Farbstoff Toluidinblau die Spindeln und Kristalle nicht anfärbbar, sie nehmen ihn erst in schwach saurem Farbbad (pH 5,6) an.

Verdauungsversuche wurden mit Trypsinlösung (0,5% Trypsin in 0,5% Na_2CO_3) und mit Pepsin (0,4% Pepsin in 0,5% HCl) durchgeführt. Mit Trypsin wurden Spindeln und Kristalle allerdings erst nach einigen Tagen verdaut, während mit Pepsin kein Verschwinden der Kristalle festgestellt werden konnte. Die Membran quillt äußerst stark und es wäre denkbar, daß dadurch das Pepsin nicht in das Zellinnere gelangt. Im Polarisationsmikroskop zeigen die Spindeln und Stäbe negative Doppelbrechung. Alle

¹ Der Name dieser früher oft als *Griffithsia furcellata* J. AG. bezeichneten Rotalge wäre in *Corynospora furcellata* zu ändern, wenn man sich der von KYLIN 1956: 383, 385 vorgeschlagenen Neugliederung der sogenannten *Griffithsia*-Gruppe anschließt. Dann wäre nämlich der Gattungsname *Neomonospora* in die Synonymie des älteren Gattungsnamen *Corynospora* J. AG. zu stellen.

diese genannten Eigenschaften deuten darauf hin, daß die Spindeln Eiweiß enthalten.

Die Eigenfluoreszenz mehrerer Rotalgen, darunter auch die der *Griffithsia*-Gruppe wurde von Wimmer und Höfler 1953 eingehend untersucht. „Bei starker Vergrößerung erkannte man, daß die Rhodoplasten anfangs allein rosa gefärbt waren, daß aber mit fortschreitender Degenera-

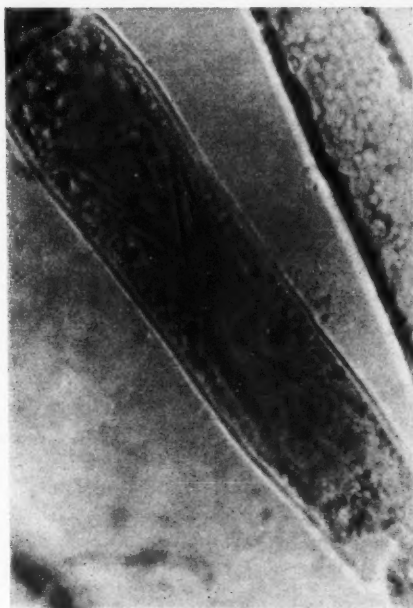


Abb. 2.

Abb. 2. Abgestorbene Zelle mit Nadelbüschel.

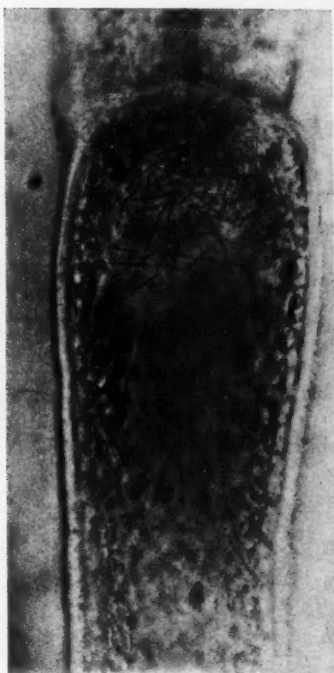


Abb. 3.

Abb. 3. Fadengeflecht aus Eiweiß in einer toten Zelle.

tion der Farbstoff andere Zellinhalte färbt.“ (S. 629, 630.) Die lebenden Zellen von *Neomonospora* sind im UV-Licht leuchtend orangerot, die toten Zellen auffallend hellgelb. Eiweißspindeln und Kristalle besitzen keine Primärfluoreszenz, fluoreszieren aber in toten Zellen durch den von ihnen aufgenommenen Farbstoff gelb. Im fixierten Material zeigen Kerne und Kristalle blaue Primärfluoreszenz. In bereits abgestorbenen Zellen findet man außer den oben beobachteten Spindeln bzw. Stäbchen parallel gelagerte, farblose Kristalle, die ebenfalls Eiweißreaktion geben (Abb. 2). Um Phykoerythrinkristalle dürfte es sich nicht handeln, weil sie niemals roten Farbstoff enthielten und sich auch in der Form von den gelegentlich auf-

tretenden, kleinnadeligen, dunkelgefärbten Phykoerythrinkristallen unterscheiden. In fixierten Algen sind diese Kristalle nicht zu sehen, wohl aber kann man in solchen wie auch in abgestorbenen zarte Fäden beobachten, die häufig an den Polen der Zellen zu finden sind und die Eiweißreaktionen geben (Abb. 3). Sie erinnern an Fadennetze, die von Weber und Kenda 1952 bei einer viruskranken *Rhipsalis cereuscula*-Pflanze beschrieben wurden.

Ob diese Eiweißspindeln und -stäbe Anzeichen einer Viruserkrankung sind, ist nur durch Überimpfung des Preßsaftes spindelhaltiger Exemplare auf spindelfreie zu erklären. Leider konnte dieser Versuch wegen Zeitmangel nicht durchgeführt werden. Eine Übertragung des Preßsaftes spindelhaltiger Pflanzen auf junge Tabakpflanzen verlief, wie vorausszusehen war, negativ.



Abb. 4 a. Abnormale Endzellen mit Eiweißkristallen.

Abb. 4 b. Normale Endzellen mit spindelförmigen und würfelförmigen Eiweißkristallen.

Die pathologischen Formen von *Neomonospora furcellata*, die verhältnismäßig häufig im Golf von Neapel vorkommen, hat schon Funk 1955 beschrieben und abgebildet. Bei diesen Anomalien handelt es sich vor allem um Verkrümmungen, Anschwellungen der Zellen, aus denen wieder neue Zellreihen hervorsprossen. Die mißgebildeten Zellen zeigen neben den üblichen Kristallen Eiweißstäbe und Spindeln (Abb. 4 a, b). Cytoplasmatische Einschlüsse, insbesondere x-bodys, die für viruskranke Pflanzen besonders charakteristisch sind, fehlen allerdings. Ziegler 1961 beobachtete in den Zellen von *Nitophyllum punctatum* und *N. micropunctatum* spindelförmige Inhaltskörper und U-Schleifen. Sie schreibt (S. 299): „Für eine Virusinfektion spricht allerdings, daß nicht alle Pflanzen Eiweißspindeln haben und daß diese auch in einzelnen Thallustücken in verschiedener Häufigkeit auftreten.“ Das gleiche ist auch für *Neomonospora furcellata* anzunehmen. Es wäre möglich, daß das Virus nicht immer stark virulent ist und daher die Alge nicht immer Krankheitssymptome zeigt.

Die biologische Bedeutung der hexagonalen Kristalle ist noch immer ungeklärt. Klein 1882 hält sie für Reservestoffe, weil man bei *Acetabularia* die Kristalle nur in solchen Exemplaren findet, die noch keine Sporen gebildet haben. Offenbar werden die Eiweißkristalle hier verbraucht. Bei anderen Algen wurde dies nie beobachtet. So berichtet Berthold 1886, daß bei manchen grünen Meeresalgen die Kristalle erst in der Zeit der Fruktifikation entstehen. Er hält sie nur für Ausscheidungsprodukte. Chemin 1931 hält die Eiweißkristalle der *Cladophora* für das Resultat einer Übersättigung des Zellsaftes an Proteinsubstanzen, die gelegentlich als Reservestoffe verwendet werden. *Neomonospora furcellata*, die ich durch

zwei Monate hindurch in Gläsern in Kaltwasserbecken im Institut weiter kultivierte, hatten in dieser Zeit noch sehr schön die Eiweißkristalle ausgebildet; in der Zeit der Tetrasporangienbildung werden sie allerdings stark vermehrt, so daß man eine ausgesprochene Reservestoffnatur der Kristalle bezweifeln möchte. Eigene Versuche, die Bildung der Eiweißkristalle durch Zufuhr stickstoffhaltiger Verbindungen zu ermöglichen, schlugen allerdings fehl, da die Algen selbst nach Zusatz von nur 0,05% Glykokoll oder 0,1% Ammonnitrat zum Seewasser bald zugrunde gingen, ohne daß sich die Menge der Einschlüsse verändert hätte.

Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften danke ich für die gewährte Subvention, Herrn Prof. Dr. Höfler für die Überlassung des vom Pflanzenphysiologischen Institut Wien gemieteten Arbeitsplatzes. Herrn Direktor Dr. Peter Dohrn danke ich für die gastliche Aufnahme in dem von ihm geleiteten Institut.

Zusammenfassung

In *Neomonospora furcellata* wurden außer den bekannten hexagonalen und kubischen Eiweißkristallen auch Eiweißspindeln und -stäbe beobachtet. Da im Golf von Neapel auch pathologische Formen vorkommen, die ebenfalls (allerdings nicht immer) diese Eiweißbildungen zeigen, wird eine Viruskrankheit vermutet.

Literatur

- Bawden, F. C., 1956: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass., U. S. A.
 Berthold, G., 1886: Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig.
 Chemin, E., 1931: Les cristaux protéiques chez quelques espèces marines du genre *Cladophora*. C. r. Acad. Sci. (Paris) 193, 742.
 Cohn, 1867: In Schultzes Archiv f. mikrosk. Anatomie 3, 24 (zit. n. Klein 1882).
 Cramer, K., 1862: Das Rhodospermin, ein krystalloidischer quellbarer Körper im Zellinhalte verschiedener Florideen. Vjschr. Naturf. Ges. Zürich 7.
 Dammann, H., 1932: Beitrag zur Kenntnis der Zentralstellen der Gattung *Ceramium*. Ber. dtsh. bot. Ges. 50, 68.
 Ernst, A., 1904: Zur Kenntnis des Zellinhaltes von *Derbesia*. Flora 93, 514.
 Feldmann-Mazoyer, G., et R. Meslin, 1939: Note sur le *Neomonospora furcellata* (J. AG.) comb. nov. et sa naturalisation dans la Manche. Rev. Gén. Bot. 51, 193.
 — 1940: Recherches sur les Céramiacées de la Méditerranée occidentale. Bull. Société d'Histoire naturelle de l'Afrique du Nord 32.
 Funk, G., 1935: Beiträge zur Kenntnis der Meeresalgen von Neapel. Pubbl. Staz. zool. Napoli 25.
 Klein, J., 1882: Die Krystalloide der Meeresalgen. Jb. wiss. Bot. 13, 23.
 Küster, E., 1899: Über *Derbesia* und *Bryopsis*. Ber. dtsh. bot. Ges. 17, 77.
 Kylin, H., 1956: Die Gattungen der Rhodophyceen. Lund.
 Miličić, D., 1956: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. Protoplasma 47, 341.
 Molisch, H., 1926: Über das massenhafte Vorkommen von Eiweißspindeln in einer *Vaucheria*. In: Pflanzenbiologie in Japan. Jena, 242.
 Thaler, I., 1954: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Österr. bot. Z. 101, 566.

- W a k k e r, J. H., 1888: Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzelle. Jb. wiss. Bot. 19.
- W e b e r, F., und G. K e n d a, 1952 a: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma 41, 111.
- — 1952 b: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma 41, 378.
- W i m m e r, C., und K. H ö f l e r, 1953: Über die Eigenfluoreszenz lebender, absterbender und toter Florideenzellen. S. B. Wien. Akad. d. Wiss., Abt. I, 162 B, 625.
- Z i e g l e r, A., 1961: Spindelförmige Inhaltskörper in den Zellen von *Nitophyllum*. Protoplasma 53, 298.

Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten

I. Die Transformation der Mitochondrien

Von

Norbert Weissenfels¹

Aus dem Zoologischen Institut und dem Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. März 1961)

Einleitung

In vitro gezüchtete Zellen eignen sich besonders gut für vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen. Aus diesem Grunde verwendet man sie auch gerne als Testobjekte auf die Wirkung von Pharmaka und ionisierenden Strahlen. Um eine sichere Aussage machen zu können, muß man aber wissen, welche Veränderungen die Normalzellen allein schon durch die Züchtungsmethode erleiden. Die Zellen eines Gewebeexplantates wandeln nämlich beim Auswachsen auf ihrem neuen, andersartigen Substrat ihre Gestalt, ein Vorgang, der sicher eine Umordnung ihrer Innenstrukturen zur Folge hat. Die Loslösung der Zellen aus dem Gewebeverband, der damit verbundene Funktionsverlust und auch die anormalen Ernährungsbedingungen verursachen darüber hinaus noch tiefergreifende morphologische und physiologische Veränderungen, die man früher für Um- und Rückdifferenzierungen hielt (Bloom 1957), heute aber in einer weniger extremen Auffassung als „Modulation“ bezeichnet (Fawcett 1953). An Hand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen soll in der folgenden Arbeit darüber berichtet werden, wie sich dieser Vorgang auf den Feinbau der gezüchteten Zellen auswirkt.

Material und Methoden

Myoblasten aus der Herzspitze 9 Tage alter Hühnerembryonen (weiße Leghorn) wurden direkt bzw. nach $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 10, 60 und 90 Kulturtagen fixiert. Die 10, 60 und 90 Tage alten Kulturen wurden zunächst in Rollertubes gezogen und 2 Tage vor dem Fixationstermin in Maximow-

¹ Herrn Professor Dr. R. Dannel zu seinem 60. Geburtstag in Dankbarkeit gewidmet.

Kammern umgesetzt (Bauer 1954, White 1954). Das Kulturmedium setzte sich zusammen aus Hühnerplasma und einem Nahrungsgemisch, das aus der synthetischen Nährflüssigkeit „TCM“ (Morgan, Morton und Parker 1950) der Behring-Werke (Marburg/Lahn) bestand, die mit 3% Serum aus menschlichem Nabelschnurblut und 5% Hühnerembryonalextrakt versetzt wurde. Die Zuchttemperatur betrug 37° C.

Zur Fixierung der explantierten Herzstückchen und der bis zu 10 Tage alten Myoblastenkulturen eignete sich ein Gemisch aus 1%igen Lösungen von Osmiumtetroxyd und Kaliumbichromat, das durch 0,9% Kochsalz isotonisch gemacht und auf pH 7,3 eingestellt wurde (Wohlfarth-Bottermann 1957). Die 60 und 90 Tage alten Kulturen waren jedoch besser fixiert, wenn dem oben angegebenen Gemisch an Stelle des Kochsalzes 3% Trauben- und 15% Rohrzucker (Bahr, Bloom und Friberg 1957, Weissenfels 1960) zugegeben wurden. Die Fixierung und Entwässerung der gezüchteten Myoblasten erfolgte auf den Deckgläsern der Maximow-Kammern. Danach wurden die Kulturen mit einem Rasiermesser vorsichtig von ihrer Glasunterlage abgehoben, weitgehend von dem umgebenden Plasmakoagulum befreit, in 4 bis 8 Teile zerlegt und schließlich in Vestopal eingebettet (Kellenberger, Schwab und Ryter 1956).

Die gesamte Präparation verlief nach folgendem Zeitplan:

- 1 Stunde Fixation,
- 1 Stunde Physiologische Lösung (nach Pannet-Compton),
- $\frac{1}{2}$ Stunde Aceton 30%,
- $\frac{1}{2}$ Stunde Aceton 50%,
- 3 Stunden Aceton 75% + 1% Phosphorwolframsäure + 0,5% Uranylacetat,
- $\frac{1}{2}$ Stunde Aceton 90%,
- 1 Stunde Aceton 100% (dreimal gewechselt),
- 1 Stunde 3 Teile Aceton + 1 Teil Vestopal W,
- 1 Stunde 1 Teil Aceton + 1 Teil Vestopal W,
- 1 Stunde 1 Teil Aceton + 3 Teile Vestopal W,
- über Nacht Vestopal W + 1% Initiator + 0,5% Aktivator,
- Einbettung mit diesem Gemisch in Gelatine kapseln,
- Polymerisation 30 Stunden bei 60° C.

Die Herstellung der Dünnschnitte geschah auf Mikrotomen der Firmen LKB, Typ 4801 A (Schweden) und Servall Inc. (USA) mit Hilfe von Glasmessern. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Präparate erfolgte mit einem Siemens-Elektronenmikroskop Typ 100 d, 60 KV, Aperturblende 30 μ . Für die Aufnahmen wurde Agfa Agepe-Film vom Format 6,5 \times 9 cm verwendet.

Zum Vergleich mit den elektronenmikroskopischen Bildern wurden jeweils gleich alte Myoblastenkulturen phasenoptisch untersucht.

Die Arbeiten wurden durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht. Herrn Prof. Dr. R. Danneel und Herrn Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann danke ich für ihre beratende Hilfe, Frl. R. Mielke, Frau K. Joppen und Frau J. Kestler-Merlin für die technische Assistenz.



Abb. 1. Ausschnittsbild eines Hühnerherzmyoblasten nach $1\frac{1}{2}$ Tagen Gewebekultur. Neben mehreren teils längs-, teils quergetroffenen Fadenmitochondrien mit quergestellten *Cristae* erkennt man in der linken unteren Bildecke ein ringförmiges Mitochondrium mit überwiegend radiär angeordneten *Cristae*, Vergr.: 55.000 : 1.



Abb. 2. Ausschnittsbild eines Hühnerherzmyoblasten nach $1\frac{1}{2}$ Tagen Gewebekultur. In der unteren Bildhälfte liegt ein verzweigtes Mitochondrium, das ebenso wie die übrigen Fadenmitochondrien quergestellte *Cristae* enthält. Vergr.: 55.000 : 1.

Feinbau und Verhalten der normalen Mitochondrien

Die ersten Untersuchungen über den Einfluß der Gewebezüchtung galten den Mitochondrien, deren Feinbau von Palade (1952) und zahlreichen anderen Autoren ausführlich beschrieben und gut bekannt ist (Danneel 1959). Diese ovalen bis schlauchförmigen Plasmakörperchen enthalten alle Atmungsfermente und sind somit wichtige Energielieferanten der Zelle (Green 1951, Lahn 1959).

Die Mitochondrien der Hühnerherzmyoblasten sind in der Regel 0,5 bis 0,6 μ dick und erreichen in Gewebekultur nach lichtmikroskopischen Messungen nicht selten eine Länge von 15 μ und mehr. Ihre maximale Länge kann an Hand von Schnittpräparaten des embryonalen Ausgangsgewebes nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Die Mitochondrien der embryonalen und normalerweise auch der gezüchteten Myoblasten (Abb. 1 und 2) besitzen eine doppellamellige Hülle. Aus dem Innenblatt entspringen zahlreiche, ebenfalls doppelt konturierte Septen, die sog. *Cristae mitochondriales* (Palade 1952, Howatson und Ham 1955, Weissenfels 1957), die überwiegend quer zur Längsachse der Mitochondrien stehen und diese in unvollständig geschlossene Kammern aufteilen. Letztere enthalten eine Grundsubstanz, die „Matrix“. Der Abstand zwischen den einzelnen *Cristae* und auch das zahlen- und mengenmäßige Verhältnis der *Cristae* zur Matrix variiert je nach Funktion der Zellen, doch weiß man hierüber noch nichts Genaueres.

Die *Cristae* vergrößern die reaktionsfähige Fläche der Mitochondrien erheblich. An ihnen sollen die Atmungsfermente so geordnet liegen, daß die umzubauenden Substrate auf dem kürzesten Wege von Ferment zu Ferment „weitergereicht“ werden können (Watson und Siekevitz 1956, Barnett und Palade 1957). Diese Theorie ist gut begründet, denn in Mitochondrienrümern, die man durch Ultraschall herstellen kann, sind sehr oft bestimmte Enzyme miteinander vergesellschaftet, die also auch bei den unverletzten Mitochondrien nahe beieinander liegen müssen (Hogboom und Schneider 1951). Komplexe Enzymsysteme werden ferner bei der Mitochondrienzertrümmerung stets leichter geschädigt als einfache.

Durch Lebendbeobachtungen wissen wir, daß die Mitochondrien ihre Gestalt rasch verändern und infolge der Plasmaströmung und der Eigenbewegungen auch ihre Lage im Zellraum. Auf diese Weise können sie die in ihnen enthaltenen Fermente mit den im Cytoplasma enthaltenen Substraten in Berührung und Wechselwirkung bringen.

Zum normalen Verhalten der Mitochondrien kann man auch die Ringbildung rechnen (Abb. 1, links unten), der eine kreisförmige Krümmung der Mitochondrien vorausgeht, deren Endstücke dann miteinander verwachsen. Hierbei kann es sich nicht um eine Vakuolenbildung innerhalb eines kugelförmigen Mitochondriums handeln, denn man erkennt außen und innen deutlich die doppelt konturierte Hüllmembran. Solche Ringbildungen treten aber relativ selten auf.

Etwas häufiger trifft man verzweigte Mitochondrien an (Abb. 2). Sie entstehen aus normalen Fadenformen, die an beliebigen Stellen eine oder

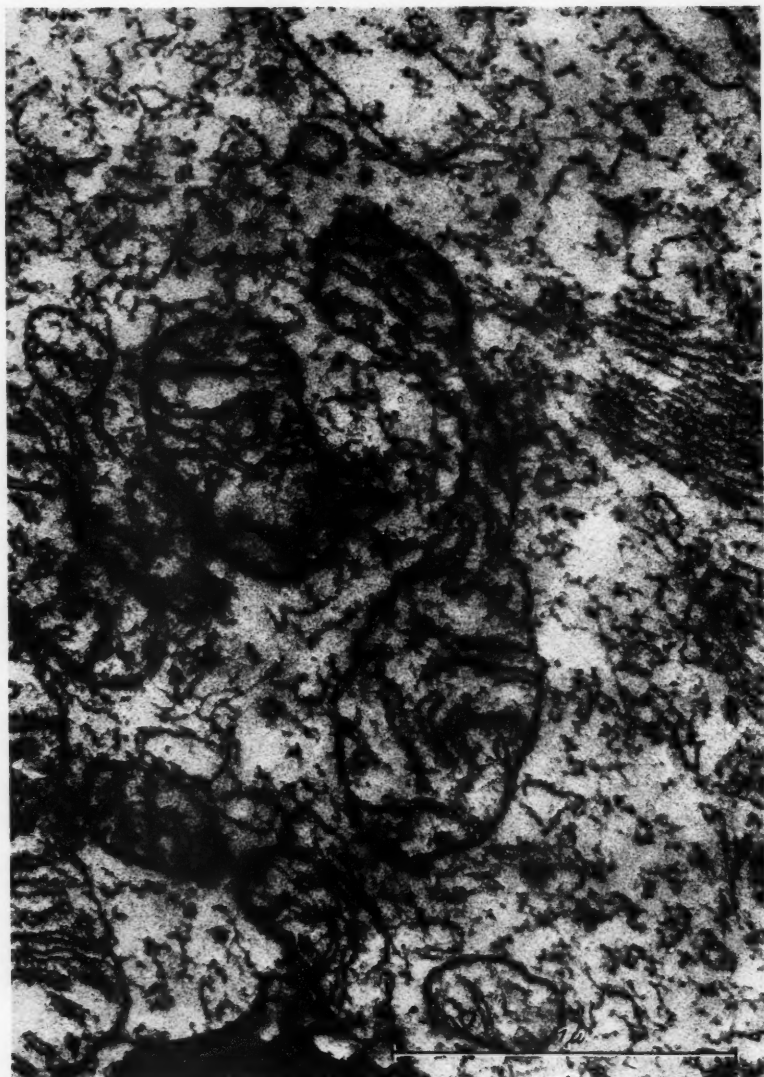


Abb. 3. Ausschnittsbild eines Hühnerherzmyoblasten nach $1\frac{1}{2}$ Tagen Gewebekultur. Man erkennt ein hantelförmiges Mitochondrium, dessen *Cristae* nicht einheitlich ausgerichtet liegen. Vergr.: 55.000 : 1.

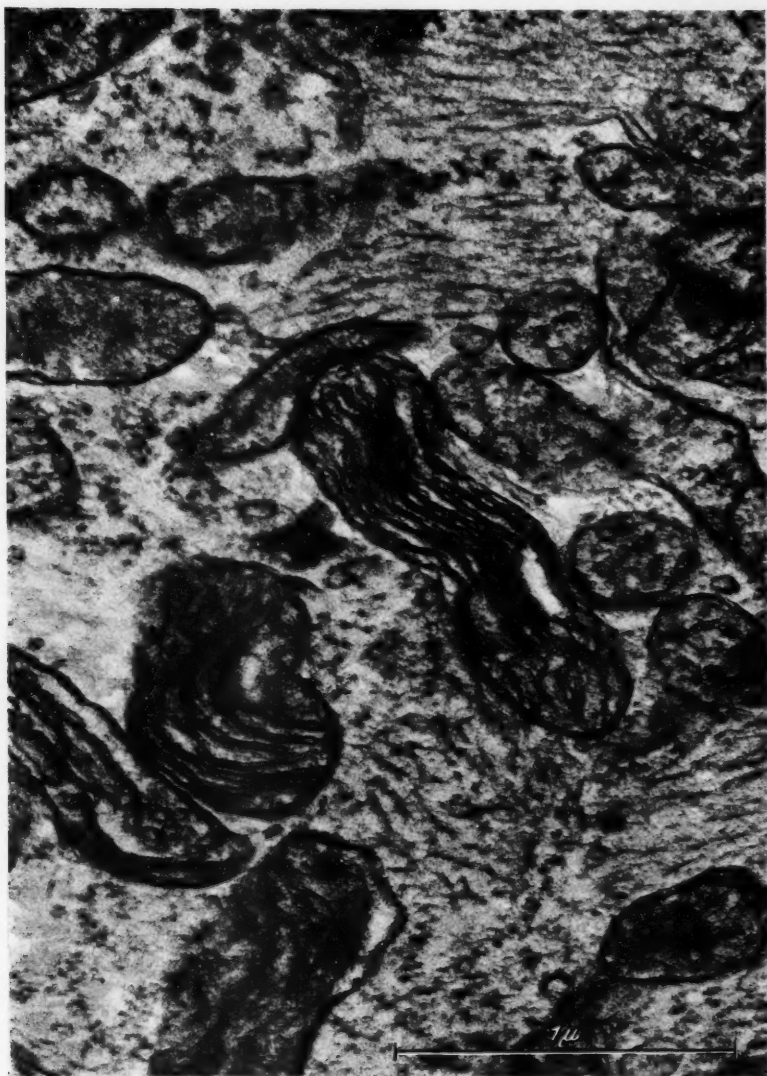


Abb. 4. Ausschnittsbild eines Hühnerherzmyoblasten nach 60 Tagen Gewebekultur. 3 Mitochondrien enthalten relativ große *Cristae*, die dicht beieinander liegen und überwiegend in Längsrichtung stehen. Vergr.: 55.000 : 1.

mehrere Seitenknospen bilden, welche dann rasch auswachsen und im elektronenmikroskopischen Bild immer reguläre *Cristae* erkennen lassen. Die Mitochondrien samt ihren komplizierten Innenstrukturen sind also weitgehend umbaufähig.

Die Mitochondrien neigen schließlich auch zur Fragmentation, d. h. sie können sich innerhalb weniger Minuten in zwei oder mehrere, meist ungleich große Stücke aufteilen. Unsere Kenntnisse hierüber stammen wiederum aus phasenoptischen Untersuchungen. In fixierten Schnittpräparaten kann man solche Teilungsstadien verständlicherweise nur selten antreffen. Im übrigen ist es natürlich sehr schwierig, aus Zustandsbildern von ultradünnen Schnitten, wie sie die Elektronenmikroskopie liefert, auf einen Vorgang zu schließen. Als Teilungsstadien kommen am ehesten hantelförmige Mitochondrien in Frage, die im Einschnürungsbereich deutlich eine ungeordnete Lagerung ihrer *Cristae* erkennen lassen (Abb. 3). Entsprechende Bilder liegen auch von *in vivo* entnommenen Myoblasten vor; man kann also annehmen, daß die Mitochondrienfragmentation, solange sie in Grenzen auftritt, keine Folge der Gewebezüchtung ist.

Während der ersten Kulturwochen verhalten sich die Mitochondrien völlig normal; ihr Feinbau läßt noch keine nennenswerten Unterschiede gegenüber dem Ausgangsmaterial erkennen.

Die Transformation der Mitochondrien bei längerer Kultur

Nach 60 Kulturtagen findet man in den Myoblasten neben ganz normalen häufig auffallend veränderte Mitochondrien, die sich in drei Gruppen einteilen lassen:

1. Mitochondrien mit sehr langen *Cristae*, die dicht beieinander liegen, und zwar in der Mitochondrien-Längsrichtung (Abb. 4).

2. Geschwollene Mitochondrien mit einer oder mehreren Vakuolen (vgl. Bargmann und Knop 1960), die vielfach auch schon im Lichtmikroskop sichtbar sind. Die *Cristae* dieser Mitochondrien sind außergewöhnlich lang, liegen relativ weit auseinander und verlaufen wellenförmig in Längsrichtung der Mitochondrien. Diese *Cristae* weisen zahlreiche Verzweigungen auf und sind an vielen Stellen miteinander verwachsen (Abb. 5).

3. Ei- bis kugelförmige Mitochondrien mit ungewöhnlich großen *Cristae*, die in dichter Packung parallel zueinander an der Außenhülle liegen und einen zentralen Hohlraum umschließen (Abb. 6).

Die transformierten Mitochondrien in den Abb. 4, 5 und 6 können als Stufen einer fortschreitenden Entwicklung aufgefaßt werden, da zwischen ihnen gewisse Übergangsformen angetroffen werden. Der Versuch, die verschiedenen Zustandsbilder der transformierten Mitochondrien sinnvoll zu ordnen, führt zu folgender Deutung:

Die *Cristae* der zunächst noch normalen Mitochondrien wachsen zu Beginn ihrer Transformation übermäßig stark heran und drücken so zunächst die einhüllenden Außenwände weit auseinander. Dabei wird den Mitochondrien eine neue Längsrichtung aufgezwungen, die senkrecht zur ursprünglichen verläuft. Bei diesem Vorgang verengen sich die Abstände der *Cristae* (Abb. 4).

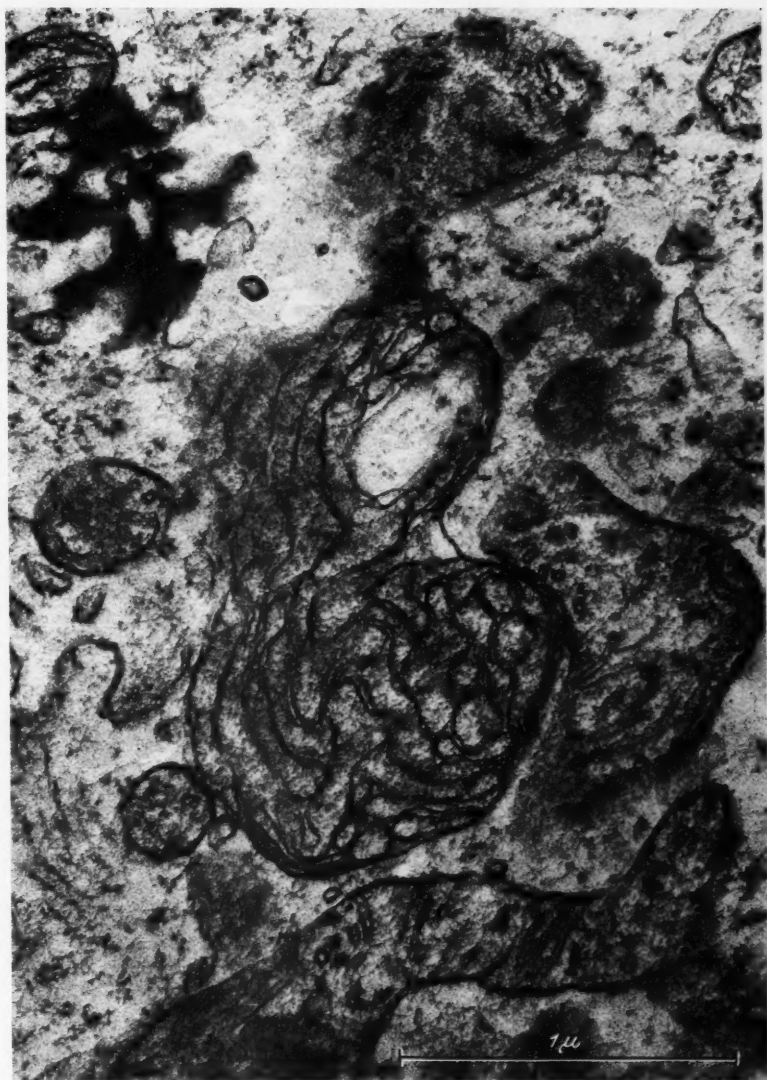


Abb. 5. Ausschnittsbild eines Hühnerherzmyoblasten nach 60 Tagen Gewebekultur. Das gequollene Mitochondrium enthält lange, gestauchte *Cristae*, die teilweise miteinander verwachsen sind. In seinem oberen Abschnitt liegt eine Vakuole. Vergr.: 55.000 : 1.

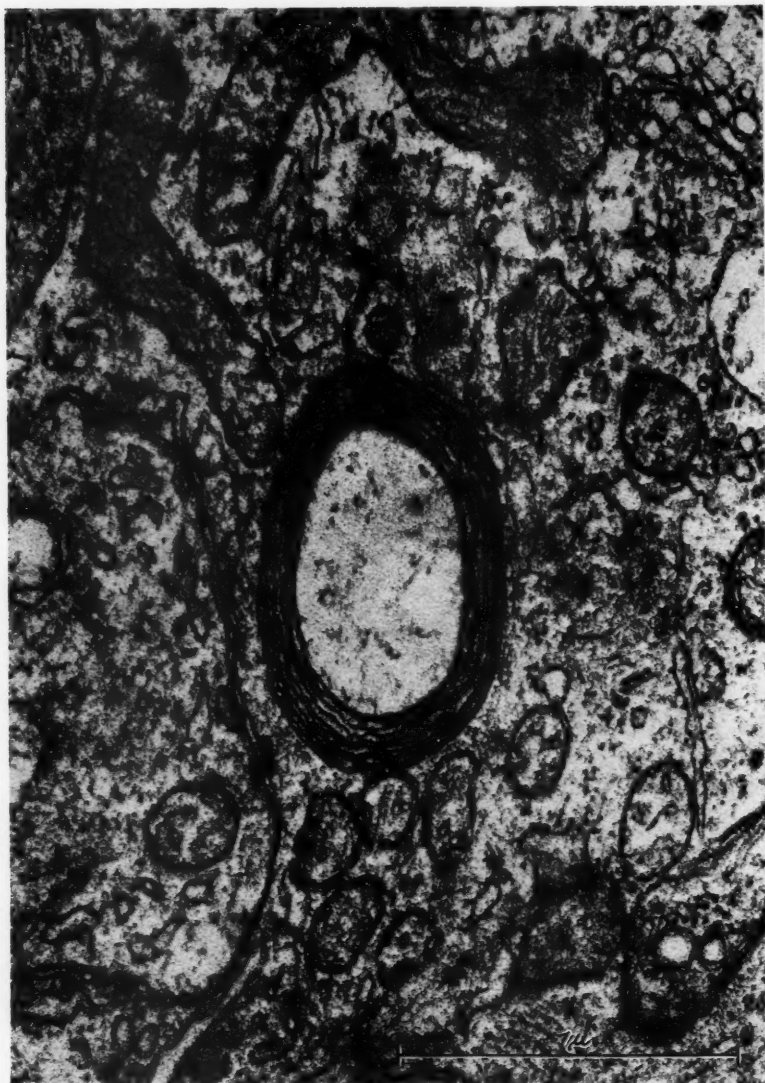


Abb. 6. Ausschnittsbild eines Hühnerherzmyoblasten nach 90 Tagen Gewebekultur. Die stark gewucherten *Cristae* des eiförmigen Mitochondriums haben sich in dichter Packung an die Innenseite der Außenhülle gelegt und umschließen einen leeren Bezirk. Vergr.: 55.000 : 1.

Wenn die Mitochondrienhüllen mit dem weiteren Wachstum der *Cristae* nicht mehr Schritt halten können, werden die letzteren gestaucht und falten sich auf. Hierbei berühren sie sich mit ihren Seitenflächen und verwachsen in den Kontaktzonen. Infolge des steigenden Innendruckes blähen sich dann die Mitochondrien mehr und mehr auf, und es kommt zu einer Vakuolenbildung (Abb. 5).

Das in Abb. 5 dargestellte Zwischenstadium der Mitochondrien-Transformation entwickelt sich wahrscheinlich wie folgt zur Endform weiter: Die gestauchten *Cristae* legen sich eng an die Innenseite der Mitochondrienhülle an und strecken sich dabei. Im Verlauf dieses Vorganges wird das Mitochondrium ei- bis kugelförmig und weist dann im Schnittbild (Abb. 6) eine ringförmige, gedrängte Schar von Membranpaaren auf, die eine mehr oder weniger strukturfreie Vakuole umschließen. Aus dem vorliegenden Bildmaterial ist aber nicht klar zu ersehen, ob die *Cristae* nach wie vor eine Verbindung mit dem Innenblatt der Außenhülle behalten haben. Hierfür spricht allerdings die Tatsache, daß die Lamellenpaare niemals geschlossene Kugeloberflächen bilden, sondern an gewissen Stellen unterbrochen sind, wie in Abb. 6 am oberen Rande des transformierten Mitochondriums.

Abschließend kann also gesagt werden, daß bei längerer Kultur von Hühnerherzmyoblasten die *Cristae* vieler Mitochondrien stark vergrößert werden. Hierdurch erhalten diese Mitochondrien ein ganz anderes Aussehen. Cytochemische Untersuchungen müssen ergeben, ob die Transformation der Mitochondrien eine sinnvolle Anpassung der Myoblasten an die Bedingungen der Gewebekultur darstellt oder ob es sich hierbei um einen pathologischen Vorgang handelt.

Die in den letzten Jahren schon mehrfach beschriebenen Gestalts- und Strukturveränderungen von Mitochondrien, welche insbesondere nach experimenteller Beeinflussung und an pathologischem Material beobachtet wurden, lassen sich mit den vorliegenden Befunden kaum vergleichen und sollen hier deshalb nicht diskutiert werden.

Zusammenfassung

Die Mitochondrien von embryonalen Hühnerherzmyoblasten sind 0,3 bis $0,6\ \mu$ dick und bis zu $15\ \mu$ lang. Sie besitzen zahlreiche *Cristae*, die überwiegend in Querstellung angeordnet sind. Die schlauchförmigen Mitochondrien bilden gelegentlich Ringformen und Verzweigungen und neigen zur Fragmentation.

Nach längerer Kultur findet man in den Myoblasten häufig transformierte Mitochondrien mit vergrößerten *Cristae*, die relativ dicht beieinander liegen und nun in Längsrichtung stehen.

Weiterhin wurden geschwollene Mitochondrien mit außergewöhnlich langen *Cristae* gefunden, die wellenförmig in Längsrichtung liegen, ferner zahlreiche Verzweigungen aufweisen und an vielen Stellen miteinander verwachsen sind. Die Entstehung dieser Gebilde kann so erklärt werden, daß die *Cristae* schneller heranwachsen als die Mitochondrienhülle, infolgedessen gestaucht werden und sich auffalten.

Im Endstadium legen sich die *Cristae* der transformierten Mitochondrien

in dichter Packung an die Innenseite der Mitochondrienhülle und umschließen einen zentralen Hohlraum.

Anschrift des Verfassers: Privatdozent Dr. Norbert Weissenfels, Bonn, Zoologisches Institut der Universität, Poppelsdorfer Schloß.

Literatur

- Bahr, G. F., G. Bloom and U. Friberg, 1957: Problems of osmium fixation. Proc. First Europ. Conf. Electr. Microscopy, Almquist u. Wiksell, Stockholm, 106—107.
- Bargmann, W., und A. Knoop, 1960: Vakuolenbildung und Mitochondrien. Z. Zellforsch. 51, 456—466.
- Barnett, R. J., and G. E. Palade, 1957: Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 577—588.
- Bauer, K. F., 1954: Methodik der Gewebezüchtung. Hirzel, Stuttgart.
- Bloom, W., 1937: Cellular differentiation and tissue culture. Physiol. Rev. 17, 589—617.
- Danneel, R., 1959: Entstehung, Funktion und Feinbau der Mitochondrien. Arbeitsgemeinschaft für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen 47, 25—66.
- Fawcett, D. W.: „Cell differentiation and modulation.“ Aus: An introduction to cell and tissue culture. The tissue culture course, 1949—1953, Cooperstown, New York, S. 70—73. Burgers Publ. Comp., Minneapolis 15 (Minn.).
- Green, D. E., 1951: The cyclophorase complex of enzymes. Biol. Rev. 26, 410.
- Hogeboom, A., and W. C. Schneider, 1951: Proteins of liver and hepatoma mitochondria. Science 113, 355—358.
- Howatson, A. F., and A. W. Ham, 1955: Electron microscopy study of sections of two rat liver tumors. Cancer Res. 15, 62—69.
- Kellenberger, E., W. Schwab et A. Ryter, 1956: L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie. Experientia 12, 421.
- Lahn, G., 1959: Morphologie, Biologie und Pathologie der Mitochondrien. Editio Cantor, Aulendorf in Württ.
- Morgan, J. F., H. J. Morton and R. C. Parker, 1950: Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 1—8.
- Palade, G. E., 1952: The fine structure of mitochondria. Anat. Rec. 114, 427—451.
- Watson, M. L., and P. Siekevitz, 1956: Cytochemical studies of mitochondria. I. The separation and identification of a membrane fraction from isolated mitochondria. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 639—652.
- Weissenfels, N., 1957: Über die funktionelle Entleerung, den Feinbau und die Entwicklung der Tumormitochondrien. Z. Naturforsch. 12 b, 168—171.
- 1960: Lichtmikroskopische, kontinuierliche Kontrolle von Präparatveränderungen während der Fixierung, Kontrastierung, Entwässerung und Einbettung bei Gewebekulturen. Vierter intern. Kongr. f. Elektronenmikroskopie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 60—65.
- White, Ph. R., 1954: The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press Comp., New York.
- Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1957: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. Naturwiss. 44, 287—288.

Über das Verhalten der Phosphatasen und Lipasen in den Nebennieren von Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie

Von

J. J. Jonek¹

Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand Prof. Dr. A. Pischinger)

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. März 1961)

Die bisherigen Arbeiten über das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatase und Lipase zeigen, daß das Vorkommen von Enzymen in den Nebennieren bei verschiedenen Tierarten als nicht ganz gesichert gilt und von einem höchst bemerkenswerten Sexualdimorphismus abhängt, der vor allem die alkalische Phosphatase betrifft. Die saure Phosphatase in den Nebennieren weist auch bei den einzelnen Tierarten große Unterschiede auf und scheint in der Rinde nur selten vorzukommen. Ähnlich wie bei den Phosphatasen scheint sich auch die Lipase in den Nebennieren zu verhalten. Gomori [4] sah eine beträchtlich verschiedenartige Verteilung der Lipase bei verschiedenen Species.

Wegen dieser zweideutigen Resultate über das Verhalten dieser Enzyme in der Nebennierenrinde wurden die Enzyme nochmals untersucht in der Hoffnung, während der pharmakologischen Hypothermie größere Enzymaktivitätsunterschiede zu erfassen. Außerdem soll diese Arbeit eine Ergänzung zu den schon gemachten morphologischen und histochemischen Beobachtungen in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen dienen. In früheren Arbeiten wurden die morphologischen Veränderungen sowie das Verhalten der Lipoide, Acetalphosphatide, Cholesterin, Vitamin C und die Succinodehydrase beschrieben [9, 10, 11, 12]. Die jetzigen Enzymuntersuchungen waren nötig, um die bisherigen Beobachtungen zu ergänzen und so ein besseres Bild über die Dynamik und Funktion der Nebennieren-

¹ Die Arbeit wurde zur Zeit eines Stipendiumaufenthaltes vom polnischen Gesundheitsministerium im Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Wien durchgeführt. Prof. A. Pischinger danke ich für die Ermöglichung der Untersuchungen und die Beratung in seinem Institut.

rinde von Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie zu bekommen.

Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial dienten Kaninchenweibchen, die in folgende Gruppen eingeteilt wurden:

Gruppe I: Kontrollgruppe, 3 Kaninchen.

Gruppe II: 3 Kaninchen, denen Largactil, Phenergan und Dolantin intramuskulär injiziert wurden und 6 Stunden insgesamt der Kälte ausgesetzt.

Gruppe III: 4 Kaninchen, bei denen 7 Stunden täglich, ähnlich wie in Gruppe II, über 7 Tage die pharmakologische Hypothermie durchgeführt wurde. Die Körpertemperatur sank bis $+20^{\circ}\text{C}$ ab. Während des Experimentes wurde auch der oxydoreduktive Zustand des Blutes untersucht. Die Ergebnisse werden in einer anderen Arbeit besprochen [12]. In Gruppe III wurden die Tiere nach dem Experiment bei Zimmertemperatur gehalten, wo es spontan zur Erhöhung der Körpertemperatur und des Blutdruckes kam.

Nach Beendigung des Experimentes wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die Nebennieren unfixiert untersucht. Es wurden im Kryostaten Schnitte von ungefähr 10μ gemacht und dann mit folgenden Methoden bearbeitet: Alkalische und saure Phosphatase nach Gomori und die Lipase nach Pearse [14]. Von den inkubierten Schnitten wurden Schwarzweiß-Bilder angefertigt.

Befunde

In der Nebennierenrinde der ersten Gruppe findet man eine inkonstante alkalische Phosphatase-Reaktion, die bei den einzelnen Nebennierenrinden von Kaninchenweibchen sehr verschieden ist. Aus den Einzelbefunden über das Verhalten der alkalischen Phosphatase ist ersichtlich, daß die Reaktion nur in der Zona arcuata und fasciculata vor sich geht (Abb. 1). Die Reaktion ist in den verschiedenen Zellen ungleich. Aus den Befunden ist ersichtlich, daß die Reaktion teils im Zytoplasma, besonders deutlich um den Zellkern positiv ausfällt. Eine stärkere Reaktion ist nur selten zu sehen; sie ist in vielen Fällen nur schwach, kann sogar ganz ausbleiben. Die innere Schicht der Zona fasciculata und die Zona reticularis sind praktisch frei von alkalischer Phosphatase (Abb. 2). Die saure Phosphatase wurde niemals in den Nebennieren von Kaninchenweibchen beobachtet, alle drei Zonen zeigten eine negative Reaktion bis auf einige Schnitte, in denen man fleckförmige schwarze Ansammlungen fand, die jedoch nicht als charakteristische Reaktion beurteilt werden konnten.

Die Lipaseaktivität (Twen 80) in der Nebennierenrinde erscheint vor allem in der Zona arcuata und fasciculata lokalisiert (Abb. 3). Meistens sieht man die Produkte der Lipasereaktion in Form verschiedener Granula. Außerdem beobachtet man in Schnitten eine unregelmäßige schwache, fleckige Reaktion, die sich von der Zona arcuata in Richtung der Fasciculata erstreckt. Die Lipaseaktivität in den einzelnen Schnitten ist ungleich und

hängt wahrscheinlich von dem mehr oder weniger starken Lipoidgehalt ab, der gleichfalls stark wechselt. In der Zona reticularis wurden nur selten kleine Lipase-Granula beobachtet, praktisch jedoch scheint sie frei von echter Lipase zu sein.

Gruppe II: Die alkalische Phosphatase ist in der Nebennierenrinde

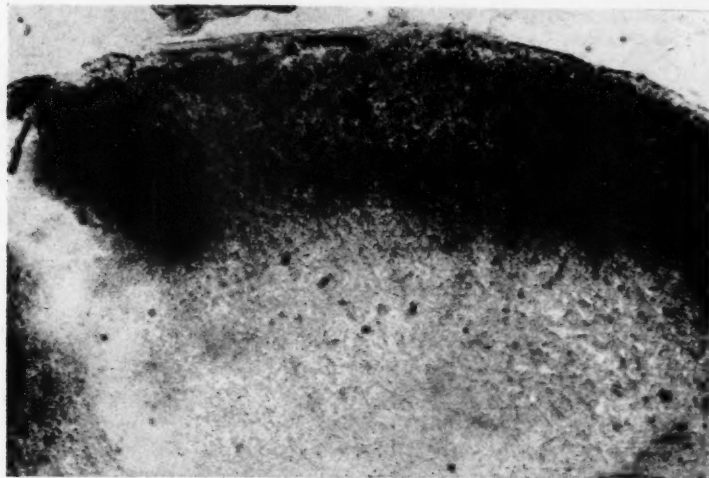


Abb. 1. Alkalische Phosphatasereaktion in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen aus der Kontrollgruppe. Vergr. 100 : 1.

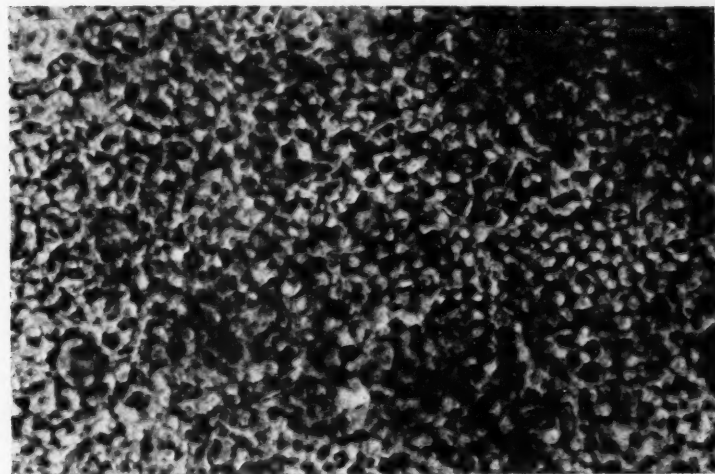


Abb. 2. Alkalische Phosphatasereaktionen in der Zona fasciculata der normalen Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen. Vergr. 150 : 1.

von Kaninchenweibchen nach sechsständiger pharmakologischer Hypothermie nur in kleinen Mengen vorhanden. Sie konnte noch in der Zona arcuata nachgewiesen werden (Abb. 4). Außerdem beobachtet man eine inkonstante fleckige Reaktion von schwacher Intensität in der äußeren Zona fasciculata. In der Zona reticularis wurde keine bemerkenswerte

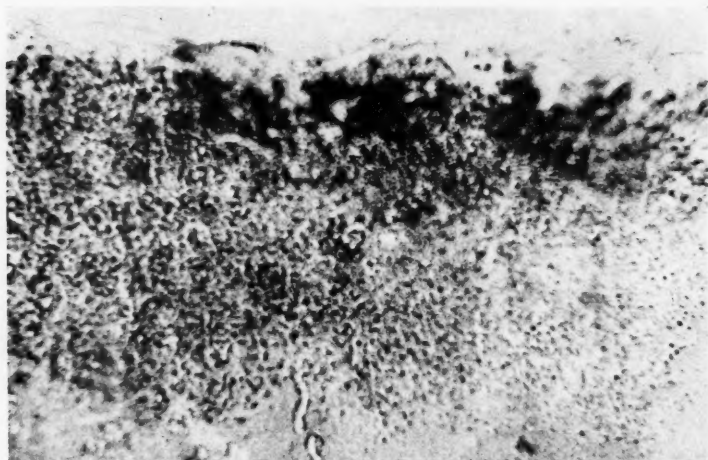


Abb. 3. Lipaseaktivität (Tween 80) in der normalen Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen. Vergr. 100 : 1.

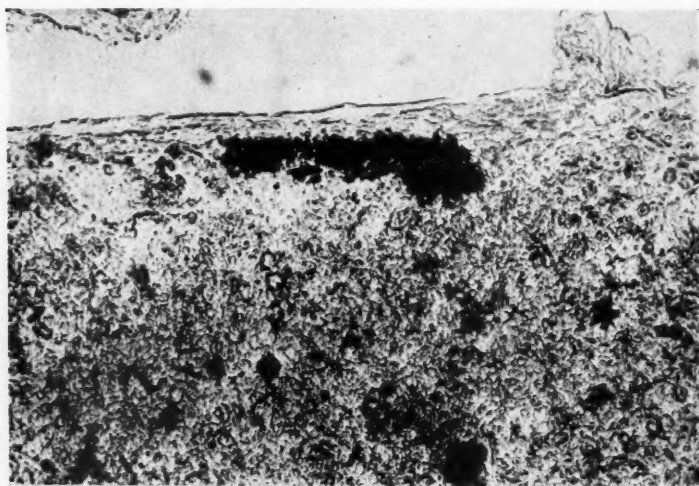


Abb. 4. Alkalische Phosphatasereaktion in der Nebennierenrinde von Kaninchen nach 6ständiger pharmakologischer Hypothermie. Vergr. 100 : 1.

Enzymaktivität beobachtet. Die saure Phosphatase wurde in keiner der drei Zonen der Nebennierenrinde von Kaninchen beobachtet. Die Lipaseaktivität ist im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr stark herabgesetzt. Es wurden nur vereinzelt kleine Granula in der Zona arcuata gefunden. Die Zona fasciculata und Zona reticularis ist vollkommen frei von echter Lipaseaktivität.

In Gruppe III wurde eine schwache alkalische Phosphatasereaktion in der Zona arcuata und Zona reticularis beobachtet. Aus den Einzelbefunden ist ersichtlich, daß die alkalische Phosphatasereaktion teils im Cytoplasma, teils im Zellkern vor sich geht. In der Zona fasciculata wurde keine Enzymaktivität nachgewiesen.

Die saure Phosphatase wurde nach sechstägiger Hibernation in der Nebennierenrinde nicht festgestellt.

Die Lipaseaktivität in den Nebennierenrinden ist sehr schwach und wurde nur in der Zona arcuata und Zona reticularis beobachtet. Sie zeigt sich in Form kleiner Granula oder als schwache, schwarz-bräunliche Flecken an. Die Zona fasciculata scheint frei von histochemisch nachweisbarer Enzymaktivität zu sein.

Diskussion

Es wurden die Befunde über das Verhalten der alkalischen, sauren Phosphatase und Lipase in den Nebennierenrinden von Kaninchenweibchen in der Kontrollgruppe und während der akuten und chronischen Hypothermie beschrieben. Bemerkenswert ist das Fehlen der sauren Phosphatase und die schwache Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Nebennieren von Kaninchenweibchen. Ähnliche Befunde wurden schon früher bei verschiedenen Species in den Nebennieren von Weibchen berichtet. Bei weißen Mäusen zum Beispiel galt das Vorkommen von alkalischer Phosphatase als nicht ganz sicher, bis Elfmann (1947 [1]), Gomori [5, 6] auf einen spezifischen Sexualdimorphismus aufmerksam machte. Einen ähnlichen Sexualdimorphismus bei Kaninchen und Hund konnte Neumann [13] feststellen. Die alkalische Phosphatase soll hauptsächlich in der äußeren Hälfte der Zona fasciculata vorkommen. Die Nebennierenrinde enthält nur selten saure Phosphatase. Bargmann [2] meint, sie soll nur in der Rinde von Mensch, Meerschweinchen und weißen Mäusen vorkommen. Auch in den Nebennieren von Kaninchen wurde sie nie festgestellt. Über die Lipaseaktivität in den Nebennieren von verschiedenen Species berichten die Arbeiten von Gomori [5, 4] und Glick [7]. Diese ist bei den verschiedenen Tieren ungleich. Die Nebennieren von Ratten sollen ganz frei von Lipase sein. Bei den Kaninchen beobachtete er eine fleckige Reaktion mäßiger Intensität. Beim Hund ist eine Enzymaktivität in der Zona glomerulosa und Zona reticularis zu beobachten. Die Verminderung der Enzymaktivität der Lipasen und alkalischen Phosphatase bei Kaninchen scheint übereinzustimmen mit früheren morphologischen und histochemischen Befunden in der Nebennierenrinde während der pharmakologischen Hypothermie bei anderen Tieren (Jonek [8, 9, 11, 12]). Das Verhalten der Lipide, Plasmae, Cholesterin und Vitamin C während der Stresswirkung wurde schon früher

beschrieben. Schließlich konnte auch eine verschiedene Dehydraseaktivität während der pharmakologischen Hypothermie beobachtet werden (Jonek [8, 9, 11, 12]).

Zusammenfassung

Es wird über das Verhalten der alkalischen, sauren Phosphatase und Lipase in Nebennieren von Kaninchenweibchen bei normalen Tieren und während der pharmakologischen Hypothermie im akuten und chronischen Stress berichtet. In den Nebennieren der Kontrollgruppe wurde eine schwache alkalische Phosphatasereaktion in der Zona arcuata und im äußeren Teil der Zona fasciculata beschrieben. Die Lipase wurde ebenfalls in den beiden Zonen beobachtet. Die Nebennierenrinde scheint frei von saurer Phosphatase zu sein. Während der pharmakologischen Hypothermie kommt es zu einem Absinken der Enzymaktivität innerhalb der Rinden-zonen.

Literatur

- [1] Elfman, H., 1947: Response of alkaline phosphatase of the adrenal cortex of the mouse to androgen. *Endocrinology* **41** b, 83.
- [2] Bargmann, R.: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd. 5, 1934. Springer-Verlag, Berlin.
- [3] Gomori, G., 1946: *Am. J. clin. Path.* **10**, 177, zit. nach R. Bargmann.
- [4] — 1948 b: Distribution of Lipase in the tissue under normal and pathologic conditions. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **68**, 354.
- [5] — 1941 b: The distribution of phosphatase in normal tissues. *J. Cellul. and Comp. Physiol.* **17**, 71.
- [6] — *Microscopic Histochemistry*, 1952. Chicago Univ. Press 1952.
- [7] Glick, D., and G. R. Biskind, 1935 a: The histochemistry of the adrenal gland. *J. of Biol. Chem.* **110**, 1.
- [8] Jonek, J., 1959: Zmiany histochemiczne w nadnerczach krolic podczas sztucznej hipotermii, lipidy. *Endokrynol. Polska*, **10**, 365.
- [9] — 1959: Zmiany zawartości acethalfosfatidów i wit. C w nadnerczach królic podczas sztucznej hibernacji. *Przegląd Lekarski S. II*, **14**, 337.
- [10] — Histologiczne zmiany w nadnerczach królic w czasie sztucznej hibernacji. *Folia Morph.* 1959.
- [11] — 1958: Zachowanie się cholesterolu i jego estrów w nadnerczach królic podczas sztucznej hibernacji. *Przegląd Lekarski S. II*, **14**, 337.
- [12] — Das Verhalten der Succinodehydrase in den Nebennieren von Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie (im Druck).
- [13] Neumann, K., 1951: Über chemisch quantitative Phosphatase-Bestimmung. *Anat. Anzeiger* **165**, 172.
- [14] Pearse, A. G. Everson, 1960: *Histochemistry*. London: J. A. Churchill, Ltd.

Zur Wirkung von α -Strahlen auf Plasma und Zellorganellen von *Allium cepa*-Epidermen¹

Von

Eduard Stadelmann

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg, Schweiz

(Eingegangen am 21. März 1961)

1. Einleitung

Über cytomorphologische Wirkungen von α -Strahlen bei Pflanzenzellen liegen erst wenige Angaben vor. So berichtet Petrová (1942, p. 407, 410) bei Bestrahlung von *Zygnema*-Fäden über Abhebung des Chromatophors von der Wand, Änderung seiner Farbe und über seine Kontraktion bei Bestrahlung der Zelle unter Ausschluss des Kerns. Biebl (1935, p. 229; 1941, p. 191) erwähnt ebenfalls als erste merkbare Veränderung bei den Chloroplasten von *Bryum capillare* deren Rundung und spätere gegenseitige Verklebung. Weitere Beobachtungen betreffen das Auftreten von Ca-Oxalat-Kristallen und Änderungen der Lage der Chloroplasten in bestrahlten Blättern von *Hookeria lucens*, sowie das Verschwinden der Ölkörper bei den untersuchten Lebermoosen (Biebl 1941, p. 193 f.).

Bei Epidermiszellen von *Allium cepa* galt eine Reihe ausführlicher Untersuchungen von Herčík (1937 f.) und Herčík u. coll. (1940) der Halbwertsdosis und dem zeitlichen Verlauf der Schädigung nach α -Strahleneinwirkung.

Zu einer ersten Erfassung nekrobiotischer Veränderungen von Plasma und Kern dieser Zellen diente Herčík (1938 b, p. 230) die supravitale Erythrosinfärbung, die in schwach geschädigten Zellen nur den Kern und in stark geschädigten Zellen Kern und Plasma tingiert.

Als Ergänzung dieser Daten soll hier von einigen kurzen Beobachtungen über die Nekrobiose von Plasma und Organellen und deren zeitlichen Verlauf berichtet werden. Bei den beschriebenen Bildern handelt es sich jedoch zweifellos nur um eine kleine Auswahl der nach solchen Einwirkungen

¹ Ausgeführt im Rahmen von Untersuchungen, die von der Atomkommission des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt werden. Der Verfasser dankt für die Gewährung der wertvollen finanziellen Hilfe.

möglichen individuellen zellulären Nekroseabläufen, deren genaue Erfassung und quantitative Auswertung noch aussteht.

Für Assistenz bei diesen Versuchen und ihrer Auswertung dankt der Verfasser Herrn Dr. G. Maas.

2. Material und Methode

Als Versuchsmaterial diente die Innenepidermis (morphologische Oberseite) der Zwiebelshuppe einer gelben Varietät von *Allium cepa*. Die Zwiebeln waren bis zur Verwendung im Versuch kühl gelagert. Von der dritten Shuppe von außen, die noch zur Zwiebelshale (Nomenklatur nach Germ 1938, p. 129) zu zählen ist, wurden in deren mittlerem Teil mit dem Messer Stücke in der Größe von 5×22 mm herausgeschnitten. Die Längsrichtung dieser Stücke war normal zur Achse des Shuppenblattes orientiert. Zur Erleichterung der Ablösung gelangten diese Stückchen in ein Fläschchen Leitungswasser und wurden für ca. 10 min an der Wasserstrahlpumpe evakuiert (Strugger 1931, p. 454; 1935, p. 7).

Die Epidermis wurde unmittelbar nach Beendigung der Evakuierung abgezogen und zum Versuch verwendet. Diese baldige Lostrennung ist erforderlich, da sich an Shuppenstückchen, die ca. 120 min in dem zur Evakuierung benutzten Leitungswasser verblieben, in den Epidermiszellen Alterationen an Leukoplasten und Chondriosomen zeigten, die denen durch Bestrahlung ähnlich sind. Auf die Möglichkeit, solcherart Schädigungen auszulösen, hat bereits Url (1960) hingewiesen.

Die α -Quelle bestand aus einer dünnen Schicht von Po^{210} , die auf einem Goldplättchen in einer kreisförmigen Fläche von ca. 7 mm Durchmesser deponiert ist. Diese Fläche ist mit einem Glimmerplättchen ($0,9 \text{ mg/cm}^2$) abgedeckt und in einer runden, mit Stiel versehenen Metallscheibe eingelassen. Die gesamte Oberfläche hatte bei Lieferung nach Angabe der Herstellerfirma (Radiochemical Center Amersham, England) eine Aktivität von 12 mC. Zur Zeit der Versuche war diese Aktivität auf etwa 3,4 mC ($= 7,5 \times 10^9$ Zerfälle/min) gesunken. Pro mm^2 der Oberfläche ($= 38,5 \text{ mm}^2$) der Quelle ergibt sich daher eine ungefähre Aktivität von 0,088 mC. Vor jedem Versuch wurde die Aktivität rechnerisch ermittelt und der Wert gelegentlich durch Kontrollmessungen überprüft.

Die aktive Oberfläche der Quelle wurde mit einem unmittelbar auf das Glimmerplättchen aufliegenden Deckglas zur Hälfte abgedeckt, so daß ein halbkreisförmiger Ausschnitt frei bleibt. Die abgezogene Epidermis wurde nun derart aufgelegt, daß die eine Querhälfte auf dieses Deckglas zu liegen kam und die andere über dem freien Teil des Glimmerplättchens der Quelle. Es blieb dabei zwischen Epidermis und Glimmerplättchen noch ein Luftspalt von maximal 0,5 mm. Auf diese Weise wurde eine unbestrahlte Kontrolle des gleichen Epidermisstückchens erhalten.

Die Epidermen wurden mit ihrer Außenseite („Perlmutterseite“) nach unten zur Strahlenquelle hingewandt (vgl. auch Biebl 1941, p. 187) und waren während der Bestrahlung von einem mit einem Tropfen Wasser versehenen Deckglas an ihrer nach oben zu frei liegenden Innenseite abgedeckt, um eine Austrocknung zu vermeiden (vgl. Herčík 1938 a, p. 201). Es war sorgfältig darauf zu achten, daß sich zwischen dem Glimmerplättchen und der Epidermis kein Wasserfilm bildete, da dieser die Strahlenintensität in unkontrollierbarer Weise herabsetzen würde.

Der Durchmesser der durchstrahlten Fläche war im Abstand von ca. 0,5 mm vom Glimmerplättchen, nach Kontrollfilmaufnahmen etwa 11 mm. Diese Vergrößerung der durchstrahlten Fläche wird durch die schräg verlaufenden Strahlen

verursacht, auf die etwa 10–20 Prozent der gemessenen Gesamtstrahlung entfallen. Die Strahlungsintensität im Zentrum verringert sich daher um diesen Betrag. Für die folgenden Angaben wurde hierfür ein Mittelwert von 15 Prozent zugrunde gelegt, so daß die Strahlungsdichte im Zentrum zum Zeitpunkt der Versuche sich schließlich zu ca. $0,075 \text{ mC/mm}^2$ berechnet ($= 16,6 \times 10^7$ Zerfälle/ $\text{mm}^2 \cdot \text{min}$).

Bei der mikroskopischen Auswertung lag die Epidermis auf einem Objektträger mit ihrer Außenseite zum Mikroskopobjektiv gewandt in Leitungswasser, das bei längerer Beobachtungszeit stets ausreichend ergänzt wurde. Zur Beobachtung stand ein Reichert-Zetopan-Mikroskop mit negativem Anoptralkontrast (Sonderform des Phasenkontrastes, vgl. G a b l e r 1955; U r l 1959, p. 401) und Trockenobjektiven $45\times$ und $65\times$ zur Verfügung.

Schwierigkeiten bei der mikroskopischen Betrachtung feinerer Details ergeben sich, wenn der Epidermis noch zahlreiche Antiklinen anhaften, welche die Beobachtung der auf der Unterseite sich schließlich ansammelnden Zellorganellen durch die Bildung von starken Diffraktionsräumen stören (vgl. U r l 1959, p. 400; Str u g g e r 1947, p. 147). Auch Epidermen, deren Zellen nur rundovale Chondriosomen besitzen, sind wenig brauchbar, da diese ihre Form beibehalten und, abgesehen von starker Bestrahlung, keine weiteren Formänderungen durchmachen.

3. Experimentelle Ergebnisse

Die Kontrollen (unbestrahlte Hälften) der Epidermen zeigten stets das bereits bekannte Bild hinsichtlich Verteilung, Größe und Form ihrer Organellen (vgl. H ö f l e r und U r l 1958; Lit.: B i e b l und U r l 1958, p. 357) und behalten dieses während der Versuchsdauer bei.

a) Schädigung bei einer Dosisdichte von 44×10^7 Zerfällen/ mm^2 (entspricht einer Bestrahlungsdauer von ca. 3 min mit dem benutzten Präparat). Die auftretenden Veränderungen am Chondriom und Plastidom sind hier nach etwa 50 min beendet.

Chondriosomen: Nur wenige der langen Chondriosomen zerfallen in Teilstücke. Sonst verändern sie ihre Form bei und nach der Bestrahlung kaum; vereinzelt — bei schwacher Schädigung häufiger — ist eine geringe Verdickung (vielleicht mit gleichzeitiger Verkürzung) festzustellen. Die Chondriosomen zeigen spannerartig krümmende und mehr ruckartige Bewegungen; letztere sind charakteristisch für bestrahlte Zellen, da die Chondriosomen in unbehandelten Zellen mehr fließende Bewegungen vollführen. Bei den Bewegungen kommt es manchmal vor, daß sich die beiden Enden eines Chondriosoms berühren. Möglicherweise vermögen diese Enden dann miteinander zu verkleben und so einen Ring zu bilden, da sich hier häufig Ringformen beobachten lassen, die in ihrer Größe mit den bekannten vakuoligen Degradationsformen der Chondriosomen (N a d s o n und R o c h l i n 1954, Tafel 2; P e r n e r und P f e f f e r k o r n 1953, p. 102 f.; H ö f l e r und U r l 1958, p. 316) nicht übereinstimmen. Letztere treten hier nicht oder nur selten — und dann erst später — auf. Bei der Körnelung des Hyaloplasmas (Nomenklatur siehe H ö f l e r 1960, p. 298) gehen die Chondriosomen früher in diesem auf als die Leukoplasten.

Leukoplasten (persistierende Proplastiden): Bei schwächsten Graden der Schädigung runden sie sich nur sehr langsam ab, sonst aber liegen sie schon am Ende oder kurz nach der Bestrahlung gerundet vor. Sie zeigen keine

Bewegung mehr. Volumänderungen wurden nicht beobachtet, Neubildungen von Vakuolen erfolgen nicht, doch bleiben vorhandene erhalten und nur selten werden Vakuolen abgetrennt (vgl. Biebl und Url 1958, p. 340). In den der Zellwand nahen Plasmamartien kann es vorkommen, daß die Abrundung ausbleibt.

Kern: Es zeigen sich bis kurz vor der Körnelung des Plasmas keine auffälligen Veränderungen. Hernach tritt Aufhellung im Phasenkontrast ein.

Sphaerosomen: Sie zeigen keine Alterationen. Ihre Verteilung im Plasma ändert sich jedoch im Laufe der Nekrobiose indem sie sich an bestimmten Stellen etwas anhäufen, ohne jedoch aneinander zu haften oder zu verkleben, wie dies schon nach UV-Bestrahlung beobachtet wurde (Biebl und Url 1958, p. 339).

Hyaloplasma: Hinsichtlich des Verschwindens der durch die Vakuole ziehenden Plasmafäden zeigten sich saisonabhängige Unterschiede: Im Wintermaterial sind schon unmittelbar nach der Bestrahlung keine solchen Plasmafäden mehr zu beobachten, während sie im Sommer auch noch einige Stunden nach der Bestrahlung (gleicher und stärkerer Dosis) zu beobachten sind. Von einem Verschwinden solcher Fäden bereits eine Stunde nach der Bestrahlung berichtet auch Herčík (1937 f., p. 148). Die Viskosität des Plasmas, wie sie sich durch die BMB zu erkennen gibt, nimmt zunächst etwas ab, dann aber fortlaufend zu (vgl. auch Herčík l. c. für eine Dosisdichte von 88×10^7 Zerfällen/mm²). In dem den Kern umgebenden Plasma ist die Viskositätszunahme deutlich verzögert (hingegen Herčík 1938 b, p. 230). Plasmaströmung ist vorhanden, solange das Plasma noch eine niedrige Viskosität besitzt und wird mit deren Erhöhung sistiert. Die Körnelung des Hyaloplasmas setzt erst nach ca. 100–200 min ein.

b) Einzelbeobachtungen bei einer Dosisdichte von $1,46 \times 10^9$ Zerfällen/mm² (entsprechend etwa 10 min Bestrahlungsdauer mit dem vorliegenden Präparat). Neben den Zellen, welche die zu erwartenden starken Schädigungsbilder aufweisen, finden sich noch einige andere, die den gleichen Grad von Schädigung zeigen, wie er unter a) beschrieben wurde. Bei den stark geschädigten Zellen laufen die Veränderungen im Chondriom und Plastidom je nach der Stärke der Schädigung innerhalb von ca. 5 bis 30 min nach der Bestrahlung ab.

Chondriosomen: Die Bildung vakuoliger Degradationsformen („Ringlein“ nach Höfler und Url 1958, p. 316) ist häufig zu beobachten und setzt innerhalb von 3 bis 5 min nach der Bestrahlung ein. Nur einige rundovale Chondriosomen behalten ihre Gestalt bis zum Aufgehen im gekörnelten Plasma bei. Die länglichen Chondriosomen zerfallen innerhalb von 5 bis 10 min nach der Bestrahlung in Teilstücke, die sich abrunden und vakuolisieren.

Leukoplasten: Sie sind zu Beginn der Beobachtung bereits alle abgerundet. Ihre Vakuolen trennen sich nach 5 bis 10 min ab.

Kern: Aufhellung setzt etwa 5 bis 10 min nach der Bestrahlung ein.

Sphaerosomen: Keine Veränderung ihres Aspekts, sie treten, wie bei schwächerer Schädigung bisweilen zu Haufen zusammen.

Hyaloplasma: Bei den nicht zu stark geschädigten Zellen ist die Plasma-

strömung zunächst noch erhöht, die Körnelung erfolgt nach ca. 40–80 min. Bei sehr stark geschädigten Zellen ist schon unmittelbar nach der Bestrahlung keine Plasmaströmung mehr sichtbar. Eine nur schwache BMB der Sphaerosomen deutet auf eine erhöhte Viskosität hin. Nach ca. 30 min ist das Hyaloplasma gekörnelt und die in ihm liegenden Organellen sind nicht mehr als solche erkennbar.

Eine andere Epidermis, welche mit der gleichen Flächendosis bestrahlt wurde und hernach in eine Durchströmungskammer (Stadelmann 1959) kam, durch welche langsam Leitungswasser durchgeleitet wurde, zeigte in den meisten Zellen ein völlig verschiedenes Nekrosebild:

Die Chondriosomen begannen erst spät mit ihren nekrotischen Alterationen. Noch ca. 2 h nach der Bestrahlung konnte bei einem langen Chondriosom beobachtet werden, wie es zunächst etwas an Dicke zunahm und hernach während der darauffolgenden ca. 10 min in Teile zerfiel, die bald ihr Volumen verkleinerten, so daß sie schließlich die Größe der Sphaerosomen oft deutlich unterschritten (vgl. Biebl und Url 1958, p. 344). Einzelne der intakten Chondriosomen waren zeitweise in einer derart lebhaften kreiselnden oder schlängelnden Bewegung, daß sie sich wohl nur durch Eigenbeweglichkeit erklären läßt (Steffen 1955, p. 584).

Leukoplasten waren nur wenige vorhanden. Das Plasma strömte während der ersten Stunden schnell, dann vorübergehend schwächer, doch blieb die Plasmaströmung noch während zweier Tage bei vielen Zellen zu beobachten, wobei weite Flächen des Plasmabelages in einer starken Rotationsströmung waren, welche Sphaerosomen und die körnigen Chondriosomenreste mitführte. Auch die intakten Chondriosomen, sofern vorhanden, wurden in größerer Zahl von der Strömung erfaßt.

Das lange Intaktbleiben der Zellen dieses Versuches würde im Sinne von Herčík (1939, p. 658) für eine Verringerung der schädlichen Wirkung durch Umspülung mit frischem Wasser sprechen, doch sollen hierüber erst spätere Versuche entscheiden.

4. Zusammenfassung

Die hier mitgeteilten orientierenden Befunde ermöglichen innerhalb der durch die individuellen Streuungen gesetzten Grenzen erste Anhaltspunkte für die Zuordnung bestimmter Nekrobioseabläufe zur einwirkenden Strahlendosis. Es ist beachtenswert, daß die gefundenen Alterationen grundsätzlich dieselbe Art und Aufeinanderfolge aufweisen, wie sie zum Teil während des natürlichen Ablaufes der Zellalterung vorkommen und auch bei anderen pathologisch wirkenden Einflüssen an Zellorganellen und Plasma beobachtet wurden (für Chondriosomen: Nach Röntgenbestrahlung: Wail und Frenkel 1925, p. 848; Nadson und Rochlin 1934; nach mechanischer Schädigung: Perner und Pfefferkorn 1953, p. 112; nach UV-Bestrahlung: Biebl und Url 1958; nach chemischen Agenzien: Höfler und Url 1958, p. 316; vgl. auch Steffen 1955, p. 586; Bautz 1956, p. 124 f.; Rouiller 1960, p. 274). Diese Unspezifität der Nekrobiosen ist wohl durch die Kleinheit der betreffenden Organisationseinheit bedingt,

so daß diese vor einem völligen Zusammenbruch ihrer Struktur nur noch zu einer geringen Anzahl von morphologischen Veränderungen befähigt ist. Je größer umgekehrt das Volumen einer Organisationseinheit (Zelle, Organismus) wird, um so stärker kann sich eine Spezifität der Alteration, Voraussetzung für jegliche Diagnostizierbarkeit pathologischer Zustände, ausbilden. Auch in biochemischer Richtung scheinen verschiedenartige Schädigungen bei den Chondriosomen gleiche Effekte auszulösen (Änderung der DNase-II-Aktivität, Okada und Peachy 1957, p. 243).

Für die von Zelle zu Zelle bestehenden Unterschiede im Ablauf der Nekrobiose wirken eine größere Zahl von Faktoren zusammen, die bisher noch nicht quantitativ übersehen werden können. Bei Epidermiszellen verschiedener Zwiebeln werden hier z. B. die Unterschiede ihrer Vorgeschichte, des momentanen physiologischen Zustandes und der Dicke der Epidermen in Betracht kommen, bei Zellen derselben Epidermis auch deren Größe, die individuelle Ausstattung mit Organellen und die Lage des Zellkerns (vgl. Herčík 1939; 1940, p. 258). Unter den Außenfaktoren, die invariabel sind, wird in erster Linie die Inhomogenität der Ionisationsdichte, die sich durch keine Geometrie verhindern läßt, zu nennen sein, da die größte Anzahl von Ionisationen knapp vor dem Ende des Strahlenweges erreicht wird.

Zur orientierenden Beurteilung der für letale Schädigung erforderlichen Strahlungsintensität diente hier als Kriterium der Gesamteindruck der Alterationen des Zellinhaltes und besonders die Plasmaströmung. Es zeigte sich, daß bei den angewandten Dosen die Absterberate der Zellen gleich nach der Bestrahlung im Durchschnitt unter 50 Prozent blieb. Plasmolysiert man jedoch die Epidermis nach der Bestrahlung, so stirbt beim Plasmolyse-eintritt eine prozentual merklich größere Zellenzahl ab. Wird Plasmolyse als Kriterium für Vitalität benutzt, so folgen daher für die Halbwertsdosis niedrigere Werte, die für die Zwiebel-Epidermiszellen nach Plasmolyse von 15 min bei 1.6×10^8 Zerfällen/mm² liegen (Herčík 1937, p. 149; vgl. auch Herčík 1939, p. 662).

Literatur

- Bautz, E., 1956: Die Mitochondrien und Sphaerosomen der Pflanzen-Zelle. Z. Botanik 44, 109—156.
- Biehl, R., 1935: Die Wirkung der α -Bestrahlung auf Protoplasma und Chloroplasten. Protoplasma 24, 225—257.
- 1941: Weitere Untersuchungen über die Wirkung der α -Strahlen auf die Pflanzenzelle. Protoplasma 35, 187—236.
- 1954: Lichtgenuß und Strahlenempfindlichkeit einiger Schattenmoose. Österr. bot. Z. 101, 502—538.
- und W. Url, 1958: UV-Strahlenwirkung auf Zellen von *Allium cepa*, besonders deren Chondriosomen und Plastiden. Protoplasma 49, 329—352.
- Gabler, F., 1955: Positiver oder negativer Phasenkontrast? Mikroskopie (Wien) 10, 119—124.
- Germ, H., 1938: Erfahrungen und Untersuchungen bei der Kühllagerung von Speisezwiebeln. Ein Beitrag zur Qualitätsbeurteilung von Speisezwiebeln. Gartenbauztg. österr. Gartenbaugesellschaft (Wien) 14, 129—154.

- Heršík, F., 1937: Über den Einfluß der α -Strahlen auf die Pflanzenzelle. *Radio-logica* 1, 145—156.
- 1938 a: Über den Durchgang der α -Strahlen durch lebendes Gewebe. *Radio-logica* 2, 200—205.
- 1938 b: Über morphologische Veränderungen in *Allium*-Zellen nach α -Bestrahlung. *Protoplasma* 51, 228—233.
- 1939: Über die Wirkung der α -Strahlen auf die Zelle mit besonderer Berücksichtigung der Kernreaktion. *Strahlentherapie* 64, 655—670.
- M. Klusáková und F. Zeman, 1940: Über die Verwendbarkeit der *Allium*-Epidermis zu strahlenbiologischen Versuchen. *Strahlentherapie* 67, 251—265.
- und R. Machek, 1940: Über den Einfluß des Zeitfaktors bei Wirkung der α -Strahlen. *Strahlentherapie* 67, 100—109.
- Höfler, K., 1960: Meiosomes and Groundplasm. *Protoplasma* 52, 295—305.
- und W. Url, 1958: Das Verhalten der Chondriosomen bei Kappenplasmolyse. *Protoplasma* 49, 307—319.
- Nadson, G. A., et E. J. Rochlin, 1954: L'effet des Rayons X sur le protoplasme, le noyau et le chondriome de la cellule végétale d'après les observations sur le vivant. *Protoplasma* 20, 31—41.
- Okada, S., and L. D. Peachy, 1957: Effects of gamma Irradiation on the Desoxyribonuclease II activity of isolated Mitochondria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 239—248.
- Perner, E. S., und G. Pfefferkorn, 1953: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderungen bei der Isolierung. *Flora* 140, 98—129.
- Petrová, J., 1942: Über die verschiedene Wirkung von α -Strahlen auf Kern und und Plasma der Zelle. *Beih. Botan. Cbl.* 61, A 399—450.
- Rouiller, C., 1960: Physiological and Pathological Changes in Mitochondrial Morphology. *Int. Rev. Cytology* 9, 227—292.
- Stadelmann, Ed., 1959: Eine einfache Durchströmungskammer (mit historischem Überblick über Durchflußkammern). *Z. wiss. Mikr.* 64, 286—298.
- Steffen, K.: Chondriosomen und Mikrosomen (Sphaerosomen). In: Ruhland, W., *Handbuch der Pflanzenphysiol.* 1, 574—613. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. 850 S.
- Strugger, S., 1931: Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 49, 455—476.
- Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 1. Aufl. Berlin 1935: Gebr. Borntraeger. 181 S.
- 1947: Die Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. *Z. Naturf.* 2 b, 146—151.
- Url, W., 1959: Phasenoptische Untersuchungen an Fruchtfleischzellen von *Symphoricarpos racemosus* Hooker. *Protoplasma* 51, 399—414.
- 1960: Persönliche Mitteilung.
- Wail, S., und S. Frenkel, 1925: Über den Einfluß der Röntgenstrahlen auf das Zellplasma. (Eine experimentellzytologische Untersuchung.) *Virchows Arch.* 257, 846—850.

Über den Feinbau der Chromatophoren von *Cladophora fracta* Kütz

Von

S. Strugger und Elisabeth Peveling

Aus dem Botanischen Institut der Westfäl. Wilhelms-Universität Münster

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. April 1961)

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den Chloroplasten der Samenpflanzen haben im Vergleich mit den Befunden an den Chromatophoren der Algen eine bemerkenswerte, prinzipielle Übereinstimmung des Feinbaues erbracht. In beiden Fällen sind es sublichtmikroskopische Lamellensysteme, welche in ein Stromaplasma eingebettet den Chloroplasten bzw. den Chromatophor aufbauen. Auch konnte sowohl für die Chloroplasten der höheren Pflanzen als auch für die Chromatophoren der Algen in jedem Falle eine Grenzschicht gegenüber dem Cytoplasma sichergestellt werden. Die sublichtmikroskopischen Lamellen differenzieren sich im Bereich der Chloroplasten der höheren Pflanzen in Stroma- und Granalamellen, während in den Chromatophoren der Algen die Lamellen sehr häufig durch den ganzen Chromatophor hindurchziehen. Gemeinsam ist aber, daß sowohl bei den Chloroplasten als auch bei den Chromatophoren je zwei Lamellen am Rande der Grana bzw. am Rande der Chromatophoren oder dort, wo sie auslaufen, miteinander kommunizieren, so daß geschlossene Doppellamellensysteme vorliegen. (Literaturzusammenfassungen bei Geitler 1954, 1957, 1959 und Mühlethaler 1955, 1956, 1957, 1959.)

Das Chromatoplasma der Cyanophyceen ist durch Niklowitz und Drews (1957), Fuhs (1958) und Hagedorn (1960) einer eingehenden Untersuchung unterzogen worden. Auch dieses für die Photosynthese tätige Chromatoplasma enthält sublichtmikroskopische Lamellen, welche einen charakteristischen, meist parallel zu den Zellwänden gerichteten Verlauf haben. Auch hier handelt es sich um geschlossene Doppellamellensysteme. Das Chromatoplasma der Cyanophyceen ist allerdings gegenüber den Chromatophoren der Grünalgen dadurch abweichend gebaut, daß eine Grenzschicht des Chromatoplasmas gegenüber dem Cytoplasma völlig fehlt.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben also gezeigt, daß der Begriff Chromatoplasma gegenüber dem Begriff Chromatophor auch in Zukunft scharf abgegrenzt bleiben muß.

Die Chromatophoren von *Cladophora* sind bisher in der Literatur nur in zwei Arbeiten elektronenmikroskopisch beschrieben worden. Die erste Arbeit stammt von *Leyon* (1954), welcher insbesondere die Pyrenoide von *Cladophora* mit den Pyrenoiden von *Spirogyra* und *Closterium* elektronenmikroskopisch verglich, ohne von *Cladophora* eine Abbildung zu bringen. Die zweite Arbeit stammt von *Mühlethaler* (1960), in welcher zur sublichtmikroskopischen Struktur des Chromatophors von *Cladophora fracta* eine elektronenmikroskopische Abbildung gebracht wird, woraus der Schluß gezogen wird, daß *Cladophora fracta* ein wandständiges, aus parallelierten Lamellen bestehendes „Chromatoplasma“ besitzt, welches durch keine Grenzschicht gegenüber dem Cytoplasma abgegrenzt ist. Die Arbeit von *Mühlethaler* erschien zu einem Zeitpunkt, zu dem wir bereits eine Reihe von ultradünnen Schnitten durch die Zelle von *Cladophora fracta* vorliegen hatten. Eine nähere Betrachtung der von *Mühlethaler* mitgeteilten elektronenmikroskopischen Aufnahme legte sofort den Gedanken nahe, daß das Objekt, welches *Mühlethaler* abbildet, nicht eine *Cladophora fracta* betrifft, sondern von einer wesentlich kleinzelligeren, fadenförmigen Cyanophycece stammt. Ein Vergleich zwischen den Dimensionen des Chromatophors und des Feinbaues einer *Cladophora*-Zelle mit der von *Mühlethaler* publizierten Abbildung ergab die Gewißheit, daß *Mühlethaler* aus einem verständlichen Versehen heraus an Stelle einer *Cladophora*-Zelle die Zelle einer fadenförmigen Cyanophycece abgebildet hat. Wir haben sofort nach dem Erscheinen dieser Arbeit Herrn Kollegen *Mühlethaler* darauf aufmerksam gemacht und in seinem Einverständnis die Revision dieser Verhältnisse übernommen.

Unsere *Cladophora fracta* wuchs in einem Aquarium, welches mit *Nitella* bestanden war. Die großen Zellen der *Cladophora*-Äste waren teilweise epiphytisch mit kleinen, fadenförmigen Cyanophyceen belegt. Es kam daher auch bei unseren Untersuchungen vor, daß an Stelle einer *Cladophora*-Zelle die Ultradünnschnittserie durch eine epiphytisch lebende Cyanophyceen-Zelle gelegt wurde, was bei der Schwierigkeit des Anspitzens der Blöckchen und bei der außergewöhnlich geringen Tiefendimension, die bei der Herstellung von Ultradünnschnitten erfaßt wird, im Bereich der Möglichkeiten liegt. So ist es also durchaus verständlich, daß das oben angedeutete Versehen in der Arbeit *Mühlethalers* eintreten konnte.

Cladophora fracta verschiedener Altersstadien wurde einem Aquarium entnommen (Wassertemperatur 20–25° C). Nach Abtrocknen des Haftwassers wurden längere Fadenstücke in 1%iger, gepufferter OsO_4 -Lösung 1½–1¾ Stunden oder in 5%iger KMnO_4 -Lösung 50 Minuten fixiert. Die in OsO_4 fixierten Algenfäden wurden anschließend 2 Std. in Leitungswasser gebracht. Die Entwässerung wurde in den Alkoholkonzentrationen 20%, 40%, 60%, 80%, 96% und zweimal in abs. Alkohol je 30 Minuten durchgeführt. In den höheren Alkoholstufen wurden die Fäden in kleinere Stücke geschnitten. Die Einbettung erfolgte in Butylmethacrylat und Methylmethacrylat 8:2, das mit Dichlorbenzoylperoxyd 90:1 versetzt war.



Abb. 1. *Cladophora fracta*, Chromatophor mit Pyrenoid und dicht liegenden Lamellen, zwischen denen vereinzelt kontrastierte Granula (L) auftreten. Durch das Pyrenoid, das aus zwei Pyrenoidkörpern (P) besteht, zieht eine Doppellamelle (DL), deren weiterer Verlauf zwischen den übrigen Chromatophorenlamellen sichtbar ist (A). Fix.: 1%iges gepuffertes OsO_4 ; Primärvergrößerung: 20.000 : 1.



Abb. 2. *Cladophora fracta*, Chromatophor mit Grenzschicht (G) und \pm weit auseinander liegenden Lamellen. Zwischen den Lamellen ist Stromastärke ausgebildet (St). Außerdem treten vereinzelt kontrastierte Granula (L) auf. Bei T ist die Grenze der dicht aneinander liegenden Teilstücke sichtbar. Fix.: 1%iges gepuffertes OsO_4 ; Primärvergrößerung: 20.000 : 1.

Polymerisiert wurde 24 Stunden lang bei 47° C im Thermostaten. — Die in KMnO_4 fixierten Algenfäden wurden kurz unter Leitungswasser abgespült und in Propylenoxyd (Spurr 1961) (je 1 Std. in 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 80%, 100%) entwässert. Danach blieben die Objekte 4 Tage in abs. Propylenoxyd liegen. Die Einbettung dieser Fäden erfolgte in einem Gemisch von Epoxy-Resins (Zusammensetzung nach Spurr 1961) über Mischungsstufen (50%, 75%, 87%, 94%, 97%) des Einbettungsmittels mit abs. Propylenoxyd. Polymerisiert wurde dieses Gemisch 4 Tage lang bei steigenden Temperaturen von 35–70° C im Thermostaten.

Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultramikrotom nach Sitte oder Porter hergestellt. — Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit dem Elmiskop IA der Fa. Siemens danken wir Herrn Prof. Dr. G. Pfefferkorn und Herrn Dr. H. Themann, Medizinische Elektronenmikroskopie der Universität.

1. Habitus des Chromatophors

Der Chromatophor von *Cladophora fracta* besteht nach lichtmikroskopischen Beobachtungen aus einem „einzigen, von zahlreichen Netzmaschen durchbohrten Körper (Hohlzylinder), in den regelmäßig Pyrenoide eingelagert sind“ (Oltmanns 1922). In Abhängigkeit von der Ernährung kommen auch Chromatophoren vor, bei denen von dem wandständigen Zylinder aus lappige Chromatophorenfortsätze ins Innere der Zelle führen. Außerdem kann der Chromatophor in zahlreiche Stücke zerfallen (Schmitz und Carter vgl. Oltmanns 1922).

In Ultradünnschnitten wird stets nur ein kleiner Ausschnitt des gesamten Chromatophors getroffen, der in Abhängigkeit von der Schnittrichtung verschiedene Aspekte zeigt. Immer aber ist zu erkennen, daß der Chromatophor aus sehr dicht aneinanderliegenden Teilstücken aufgebaut ist, deren Abstände lichtmikroskopisch gar nicht und elektronenmikroskopisch nur schwer auflösbar sind (Abb. 2). Die Lamellen, die den Chromatophor aufbauen, können sehr dicht liegen (Abb. 1 und 3) oder \pm weit voneinander entfernt sein (Abb. 2 und 4). Diese unterschiedliche Ausbildung kann auf verschiedene physiologische Zustände oder auf junge und ältere Stadien zurückzuführen sein. Vereinzelt werden in einem Chromatophor Übergänge zwischen beiden Ausprägungen gefunden. Auf Grund der Häufigkeit der Pyrenoidanschnitte konnten wir feststellen, daß die Chromatophoren mit dichtem Lamellenbau häufiger Pyrenoide in den Ultradünnschnitten aufweisen als die mit lockerem Lamellenbau. Diese Beobachtung kann mit einer verschiedenen dichten Lagerung der Pyrenoide erklärt werden. In den Chromatophoren mit \pm weit entfernt liegenden Lamellen ist vereinzelt Stromastärke zu finden.

Die Chromatophoren mit dichten Lamellen sind an den Stellen, wo sie kein Pyrenoid enthalten, durchschnittlich $0,5 \mu$ breit; dort, wo ein Pyrenoid eingelagert ist, beträgt die durchschnittliche Breite $1,58 \mu$. Die das Pyrenoid umgebenden Chromatophorenabschnitte haben eine Breite von etwa $0,24 \mu$. Diese Ausmessungen entsprechen den Beobachtungen, daß die Lamellenzüge in Pyrenoidnähe auseinanderweichen und das Pyrenoid umgeben. Die Breitenausdehnung der Chromatophoren mit aufgelockerten Lamellen beträgt etwa $1,44 \mu$.

2. Begrenzung und Lamellenstruktur des Chromatophors

Der Chromatophor ist durch eine deutliche, kontrastreiche Grenzschicht vom Cytoplasma getrennt (Abb. 2, 3 und 4). Sie ist nach Osmiumfixation nicht immer deutlich sichtbar, tritt jedoch nach Kaliumpermanganatfixation überall hervor. Bestimmungen ihrer Dicke ergeben nach OsO_4 -Fixation einen Durchschnittswert von 100 Å. Nach KMnO_4 -Fixation zeigt sich, daß die Grenzschicht wie bei den Chloroplasten der höheren Pflanzen aus zwei kontrastierten feinen Lamellen und einer kontrastlosen Zwischenschicht besteht (Abb. 3). Für die gesamte Grenzschicht ergab sich hiernach ein Durch-

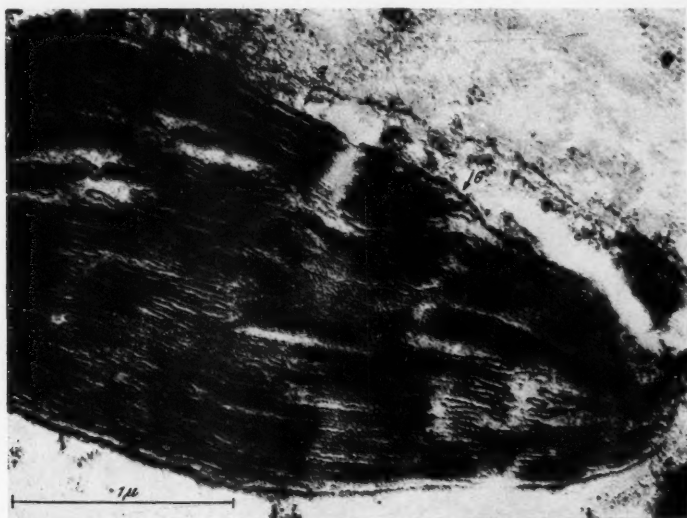


Abb. 3. *Cladophora fracta*, Ausschnitt aus einem Chromatophor. Die Grenzschicht (G) ist doppelt konturiert, die Lamellen sind als geschlossene Doppellamellen zu erkennen. Fix.: 5%iges KMnO_4 ; Primärvergrößerung: 8000 : 1.

schnittswert von 188 Å; die Einzellamellen wurden mit 72 Å und ihr Abstand voneinander mit 50 Å bestimmt.

Der gesamte Chromatophor ist aus zahlreichen, stark kontrastierten Lamellen aufgebaut, die verschieden dicht liegen können. Nach Osmiumfixation scheinen sämtliche Lamellen gleichwertig nebeneinander zu verlaufen (Abb. 1), besonders dann, wenn sie sehr dicht liegen. Ihre Breite und ihr Abstand sind in diesem Falle mit durchschnittlich 50 Å annähernd gleich. In Chromatophoren mit aufgelockerten Lamellen ist nach Osmiumfixation bereits an mehreren Stellen ein engerer Zusammenhang zwischen jeweils zwei Lamellen zu beobachten (entsprechende Stellen siehe Abb. 2). Nach KMnO_4 -Fixation wird deutlich, daß jeweils zwei einzelne Lamellen zu einer Doppellamelle vereinigt sind (Abb. 3). Diese Doppellamellen durchziehen nicht immer den ganzen Chromatophor, sondern können nach ver-

schieden langem Verlauf enden und sind an diesen Stellen in sich geschlossen. Für die Gesamtbreite der Doppellamellen ergab sich ein Mittelwert von 374 Å, die einzelnen kontrastierten Lamellen sind 110 Å breit und liegen 120 Å auseinander.

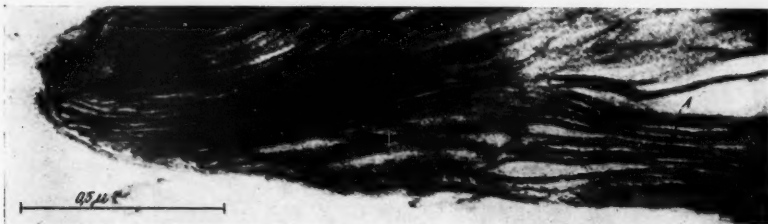


Abb. 4. *Cladophora fracta*, Ausschnitt aus einem Chromatophor mit dem Lamellenverlauf am Chromatophorenende und vereinzelt „Verzweigungsstellen“ (A) der Lamellen. Fix.: 5%iges KMnO_4 ; Primärvergrößerung: 20.000 : 1.

Deutliche Verzweigungsstellen der Lamellen konnten nicht beobachtet werden. Nur vereinzelt sind Ausbildungen zu sehen (Abb. 4), wie sie im Chloroplastentyp von *Zea mays* beim Übergang von Stroma- in Granalamellen zu finden sind (Hodge 1955 vgl. Mühlethaler 1955).



Abb. 4 a. Schematische Darstellung des Lamellenverlaufes am Ende der Chromatophorenteilstücke.

Der Lamellenverlauf an den Rändern der Chromatophorenteilstücke bleibt nach Osmiumfixation unklar; die Lamellen laufen \pm diffus aus (Abb. 2). Nach Kaliumpermanganatfixation zeigt sich, daß an den Enden der Chromatophorenteilstücke die Doppellamellen stets geschlossen sind (Abb. 4 und 4 a).

3. Pyrenoide, Stärke und kleine, kontrastreiche Einschlüsse im Chromatophor

Die Pyrenoide, die regelmäßig im Chromatophor verteilt sind, haben eine ovale Form und sind durchschnittlich $0,77 \mu$ breit (Abb. 1 und 5). Sie bestehen aus zwei kontrastreichen Pyrenoidkörpern, von denen jeder außen herum von einer sektorial geteilten Stärkeschicht umgeben ist. Ob diese Pyrenoidkörper denen von *Spirogyra* (Butterfass 1957) und *Anthoceros* (K a j a 1957) entsprechen, wo zahlreiche Pyrenoidkörper das Pyrenoid aufbauen, kann nicht entschieden werden. Die beiden Pyrenoidkörper von *Cladophora* werden durch eine Doppellamelle getrennt, die einen Spalt zwischen den Pyrenoidhälften ausbildet. Je nach Schnittrichtung erreicht dieser Spalt eine Breite bis zu 885 Å. Die Doppellamelle zwischen den Pyrenoidkörpern scheint, nach einigen Abbildungen zu urteilen (Abb. 1), von den Chromatophorenlamellen auszugehen und nach dem Durchgang durch das Pyrenoid wieder zwischen den übrigen Chromatophorenlamellen weiter zu verlaufen. Das Pyrenoid scheint an dieser Doppellamelle im Chromatophor

„aufgehängt“ zu sein. Die beschriebene Ausbildung entspräche dem Lamellenverlauf zwischen den Pyrenoidkörpern bei *Anthoceros* (K a j a 1957).

Die Pyrenoidkörper sind durch die einzelnen kontrastierten Schichten dieser Doppellamelle nach innen begrenzt. Eine ähnliche Grenzschicht läuft außen um die Pyrenoidkörper herum. Nach Osmiumfixation ist sie vielfach abgehoben (Abb. 1), während sie nach Kaliumpermanganatfixation (Abb. 5) eine klare Trennung zwischen Pyrenoid und Stärke angibt. Dieselbe Trennung ist nach Kaliumpermanganatfixation auch zwischen Stärke und Chromatophorenlamellen zu sehen (Abb. 5). Es entsteht die Frage, ob es sich hierbei wieder um Doppellamellen handelt, die zwischen den übrigen

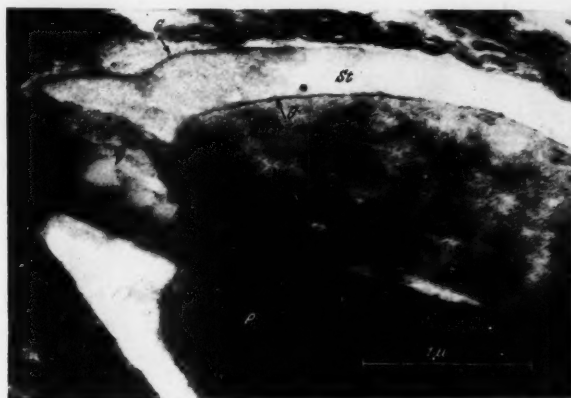


Abb. 5. *Cladophora fracta*, Ausschnitt aus einem Chromatophor mit Pyrenoid (P) und Stärkeschicht (St). Pyrenoid und Stärke zeigen eine Grenzschicht (G). Die Verbindung zwischen Pyrenoid und Chromatophorenlamellen ist stark ausgeprägt (V).

Fix.: 5%iges KMnO_4 ; Primärvergrößerung: 8000 : 1.

Chromatophorenlamellen weiter ziehen, oder ob es eine Grenzschicht ist, die die Stärke umgibt. Die von den übrigen Lamellenausmessungen abweichenden Werte von 90 Å für diese Begrenzung sprechen nicht für fortlaufende Chromatophorenlamellen. Eine Weiterführung dieser Begrenzung zwischen den Chromatophorenlamellen ist auch in Abb. 5 nicht zu beobachten.

Eine gelegentlich sichtbar werdende Eigenstruktur der Pyrenoidkörper konnte nicht einwandfrei analysiert werden. In den Chromatophoren, in denen die Lamellen aufgelockert liegen, ist stellenweise Stromastärke ausgebildet (Abb. 2). Das Erscheinungsbild dieser Stärke ist das gleiche wie in den Chloroplasten der höheren Pflanzen.

Gelegentlich kommen in den Chromatophoren von *Cladophora* einzeln oder zu Komplexen vereinigt stark kontrastierte Gebilde vor. Sie entsprechen den Globuli, die in Chloroplasten höherer Pflanzen beobachtet werden (vgl. F a l k 1960). Ihr Durchmesser in den Chromatophoren von *Cladophora* schwankt um 750 Å. Die Lamellen sind an diesen Stellen ausgebogen und ziehen um die Globuli herum.

Zusammenfassung

Die Chromatophoren von *Cladophora fracta* werden nach OsO_4 - und KMnO_4 -Fixation beschrieben.

1. Die Chromatophoren besitzen eine 100–190 Å dicke Grenzschicht. Nach KMnO_4 -Fixation wird sichtbar, daß sie aus zwei kontrastreichen Lamellen und einer kontrastlosen Zwischenschicht besteht.

2. Die Chromatophoren enthalten 50 Å breite, \pm dicht liegende Lamellen. Nach KMnO_4 -Fixation erscheinen am Rande der Chromatophorenteilstücke je zwei Lamellen verbunden, so daß geschlossene Doppellamellen vorliegen.

3. Die Pyrenoide sind zwischen die Lamellensysteme eingelagert und sind durch eine Grenzschicht von den Lamellenpackungen des Chromatophors getrennt. Sie besitzen zwei stark kontrastierte, in ihrer Struktur nicht näher auflösbare Pyrenoidkörper, zwischen denen eine schmale Doppellamellenschicht des Chromatophors nachzuweisen ist. Die Pyrenoidkörper sind radiär von Stärke umgeben.

4. In den locker gebauten Chromatophoren kommen zwischen den Lamellenlagen Stromastärke sowie stark kontrastierte Globuli vor.

Literatur

- Butterfass, Th., 1957: Über Grana, Karyoide und Pyrenoide von *Spirogyra*. Protoplasma 48, 368.
- Falk, H., 1960: Magnoglobuli in den Chloroplasten von *Ficus elastica* Roxb. Planta 55, 525.
- Fuhs, G. W., 1958: Untersuchungen an Ultradünnschnitten von *Oscillatoria amoena* (K.) Gomont. Protoplasma 49, 523.
- Geitler, L., 1954, 1957, 1959: Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle. Fortschr. Bot. XVII, 1; XX, 1; XXII, 1.
- Hagedorn, H., 1960: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Blaualgen. Naturwiss. 47, 430.
- Kaja, H., 1957: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Chromatophoren von *Anthoceros laevis* L. Ber. dtsch. bot. Ges. LXX, 343.
- Leyon, H., 1954: The Structure of Chloroplasts. Exp. Cell Res. 6, 497.
- Mühlethaler, K., 1955, 1956, 1957, 1959: Submikroskopische Morphologie. Fortschr. Bot. XVIII, 51; XIX, 38; XX, 29; XXII, 49.
- 1960: Die Struktur der Grana- und Stromalamellen in Chloroplasten. Z. wiss. Mikroskopie 64, 444.
- Niklowitz, W., und G. Drews, 1957: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. Arch. Mikrobiol. 27, 150.
- Oltmanns, F., 1922: Morphologie und Biologie der Algen. Jena 1922.
- Spurr, A. R., 1961: Mündliche Mitteilung.

Untersuchungen über Strahlenschutz an Pflanzenzellen

II. Schutzwirkung verschiedener schwefelhaltiger Verbindungen gegen kurzwellige UV-Strahlen¹

Von

Richard Biebl, Walter Url und Gertrude Janeček

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 17 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. Mai 1961)

Inhalt

Einleitung	263
Material und Methode	265
I. Die Wirkung verschiedener Bereiche kurzwelliger UV-Strahlen	267
1. Versuche mit Schott-Filtern	267
2. Versuche mit Küvetten-Filtern	271
a) Resistenzgrenzen	271
b) Wirkung subletaler Bestrahlungen mit verschiedenen UV-Bereichen auf das Protoplasma	277
II. Schutz durch Vorbehandlung mit den in Küvetten auf ihre physikalische UV-Absorption geprüften Stoffe	285
1. Stoffe ohne wesentliche UV-Absorption	283
2. Stoffe mit starker UV-Absorption	287
a) Schutzwirkungen bei subletaler Bestrahlung	287
b) Schutz gegen letale UV-Bestrahlung	290
Besprechung der Versuche	294
Zusammenfassung	302
Literatur	304

Einleitung

In einer vorangegangenen Arbeit (Biebl, Url, Janeček 1961), auf die auch hinsichtlich Literatur zur Theorie des chemischen Strahlenschutzes an Pflanzen verwiesen sei, wurde eingehend die Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen kurzwellige UV-Strahlen ($< 310 \text{ m}\mu$) untersucht.

¹ Research carried out with the support of the International Atomic Energy Agency.

Durch 30 Minuten lange Vorbehandlung von Innen- und Außenepidermen der Zwiebelnshuppen von *Allium cepa* mit 0,1—0,5 mol Thioharnstoff konnte ein Schutz bis auf das Siebenfache der für unbehandelte Kontrollen geltenden Letaldosis erzielt werden. Diese starke Schutzwirkung ist mit den bisherigen Erfahrungen über chemischen Strahlenschutz nicht vereinbar.

Es wurden daher nicht vorbehandelte Schnitte zur Hälfte mit 1 cm tiefen Quarzküvetten abgedeckt, die Thioharnstoff in Mengen enthielten, die einer 5μ bzw. 10μ dicken Schicht einer 0,1, 0,2 und 0,5 mol. Thioharnstofflösung entsprachen. Die Schutzwirkung war weitgehend ähnlich jener, wie sie durch die 30 Minuten lange Vorbehandlung der Schnitte mit gleich konzentrierten Lösungen erzielt worden war. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß zumindest die wesentliche Schutzwirkung des Thioharnstoffes in der Pflanzenzelle auf dessen hoher UV-Absorption beruht.

Die Messung der UV-Transmission der zu den Versuchen verwendeten Lösungen mittels eines Beckmann-Spektrophotometers bestätigte die starke UV-Absorption des Thioharnstoffes und machte auch die mit der Abnahme der Konzentration abnehmende Schutzwirkung als Folge der Verschiebung der Transmissionsgrenzen immer weiter in den kurzwelligen Bereich der UV-Strahlung verständlich.

Da auch eine 1 cm tiefe, mit 2%iger Essigsäure gefüllte Quarzküvette, die das kurzwellige UV bei etwa $230 m\mu$ abschneidet, der darunterliegenden Zwiebelepidermis noch einen beträchtlichen Filterschutz gewährt, erscheint erwiesen, daß die verwendete UV-Strahlenquelle noch reichlich Strahlen kürzer als $230 m\mu$ aussendet und daß diese eine stark schädigende Wirkung auf das Protoplasma ausüben. In diesem Bereich dürfte es aber schon zu stärkeren strahlenchemischen Zerlegungen mit Bildung von Ionen, Radikalen und Peroxyden kommen (Livingstone 1955), so daß hier auch ein chemischer Strahlenschutz wirksam werden könnte. Dies blieb weiter zu verfolgen.

In vorliegender Untersuchung wurde vor allem die Wirkung verschiedenster schwefelhaltiger Verbindungen auf ihre Schutzwirkung gegen kurzwellige UV-Strahlen geprüft. Diese Stoffe wurden gewählt, weil sich unter ihnen eine Reihe solcher finden, die schon im Tierversuch, wie auch an Bakterien und gelegentlich an höheren Pflanzen als chemische Strahlenschutzstoffe, meist gegen die Wirkung von Röntgenstrahlen, erkannt wurden (Zusammenfassungen: Bacc und Alexander 1958, Hollaender et al. 1959).

Die in unserer vorangegangenen Studie gewonnenen Erfahrungen über den ausschlaggebenden Anteil der physikalischen Absorption an der Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen den schädigenden Einfluß kurzwelliger UV-Strahlen auf Pflanzenzellen legte es nahe, vorerst für alle auf ihre Schutzwirkung zu prüfenden Stoffe in den in Frage kommenden Konzentrationen deren UV-Transmission bzw. -Absorption zu bestimmen. Wir erhielten dadurch eine solche Auswahl von Flüssigkeitsfiltern für die verschiedenen Bereiche kurzwelliger UV-Strahlung, daß sich von selbst eine Zweiteilung unserer Arbeit anbot: 1. die Untersuchung der Resistenzgrenzen und zytomorphologischen Veränderungen an Zwiebelepidermiszellen in den

verschiedenen Bereichen kurzweiliger UV-Strahlung unter Verwendung von Küvettenfiltern und erst 2. die Untersuchung der Schutzwirkung dieser Stoffe gegen kurzwelliges UV nach Vorbehandlung der Zwiebelepidermen mit diesen Substanzen.

Material und Methode

Als Versuchsobjekte dienten auch in dieser Untersuchung in erster Linie Innenepidermen der von außen gezählt zweiten oder dritten fleischigen Schuppe der Zwiebel von *Allium cepa*. Die leichte Präparierbarkeit der einschichtigen Zwiebelhäutchen nach der von Strugger (1935) beschriebenen Methode (Einschneiden der Innenepidermis eines Sektors einer Zwiebelschuppe durch Längs- und Querschnitte in rechteckige Felder, Entlüftung bzw. Infiltration mit Wasser in einem weithalsigen Fläschchen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und Abhebung der sich nun leicht loslösenden Epidermisstückchen mit einer Pinzette) ermöglichte die Verwendung einer großen Zahl weitgehend gleichwertiger, unverletzter Schnitte für jeden Versuch.

Für die Untersuchung der Wirkung gefilterter UV-Strahlung wurden die auf einer Glasplatte auf wassergetränktes Filterpapier gelegten Schnitte zur Hälfte mit dem entsprechenden Glas- oder Küvettenfilter bedeckt, so daß die zweite, vollbestrahlte Hälfte die Wirkung der Gesamtstrahlung erkennen ließ. In einigen Fällen wurden auch längere Epidermisstreifen verwendet, so daß von beiden Schmalseiten her je ein Drittel des Schnittes mit einem Filter bedeckt werden konnte, wobei das dazwischen freibleibende, mittlere Drittel als Kontrolle für die Wirkung der ungefilterten Gesamtstrahlung diente.

Die Abdeckung mit einem WG₅-Filter der Fa. Schott & Gen. erwies sich als gleichwertig einer Abdeckung mit einem völlig strahlenundurchlässigen schwarzen Plättchen. Alle beobachteten Schadwirkungen der UV-Strahlen wurden daher durch Wellenlängen kürzer als etwa 310 m μ ausgelöst.

Der Vergleich mit einer solchen „unbestrahlten“ Kontrolle am selben Schnitt ist notwendig, um damit auch jene Veränderungen zu berücksichtigen, die Plasmaströmung oder Chondriosomen und Leukoplasten durch die Vorbehandlung oder durch verschieden lange Wässerung erfahren. Wie auch von Alexandrow und Grousova (1960) beschrieben, zeigen nämlich die frisch von den Zwiebelschuppen abgehobenen Innenepidermen meist nur eine sehr schwache Plasmaströmung und kurze Chondriosomen, während nach mehrstündiger Wässerung die Plasmaströmung erst intensiv einsetzt und die Chondriosomen ihre langgestreckten, flexibel im strömenden Plasma sich schlängelnd bewegenden Formen annehmen. Nur der Vergleich mit den, abgesehen von der Bestrahlung, vollkommen gleich behandelten Kontrollen am selben Schnitt erlaubt daher die Wirkung der Strahlung klar zu erfassen.

Als Strahlenquelle diente wie in der vorangegangenen Arbeit eine Astralux-Quarzanalysenlampe mit einem geraden Hochdruckquarz-brenner (AS 300) aus 23 cm Entfernung bei normaler Netzspannung von 220 Volt.

Um einen Vergleich mit unseren älteren Arbeiten zu ermöglichen, erfolgte die Dosisangabe wiederum durch die Bestrahlungsdauer.

Folgende Substanzen wurden, sowohl in Küvettenfiltern (1 cm tiefe Quarzküvette) wie durch Vorbehandlung der Zwiebelepidermen mit ihnen, geprüft:

Harnstoffderivate und verwandte Verbindungen:

Harnstoff	S-Methylthioharnstoff
Thioharnstoff	Aminoethylisothioharnstoff (AET)
Methylthioharnstoff	Methylallylisothioharnstoff (MAT)
Dimethylthioharnstoff	Semicarbazid
Tetramethylthioharnstoff	Thiosemicarbazid
N-Acetylthioharnstoff	Thioazetamid

Thioalkohole:

Mercaptoethanol	Thioglycerin
-----------------	--------------

Schwefelhaltige organische Säuren:

Na-thioglycolat	Cystein
Glutathion (red. Form)	

Anorganische Schwefelverbindungen:

Na-dithionat	Na-thiosulfat
--------------	---------------

Zur Durchführung der Schutzversuche durch Vorbehandlung wurden die Schnitte im allgemeinen für 30 Minuten in die betreffenden Lösungen (meist 0,1 mol oder 0,2 mol) eingebracht und dann zur Bestrahlung auf Filterpapier aufgelegt, das mit den gleichen Lösungen getränkt war. Dadurch wurde die Gefahr eines Herausdiffundierens der eingedrungenen Lösung im Verlauf der Bestrahlung vermieden. Vor der Bestrahlung wurden die Schnitte stets oberseits mit einem trockenen Filterpapier abgesaugt, so daß keine Filterwirkung seitens einer überstehenden Flüssigkeit gegeben war. Eine an den vorbehandelten Schnitten auftretende Schutzwirkung durch physikalische Absorption („konkurrierende Absorption“) war daher ausschließlich auf jene Stoffmengen zurückzuführen, die in die Zellwand oder in den Protoplasten eingedrungen waren.

Die Beobachtung der Strahlenschädigung bzw. des durch die Filter oder durch die Vorbehandlung erzielten Schutzes erfolgte 24 Stunden nach der Bestrahlung. Während dieser Zeit lagen die Schnitte in Leitungswasser. Das Überschreiten der Resistenzgrenze war am Absterben der Zellen zu erkennen. Als Anzeiger subletaler Schädigungen dienten Schnelligkeit des Plasmolyseeintrittes (Änderung der Wasserpermeabilität), Plasmolyseform (Änderung der Viskosität), Plasmaströmung sowie Veränderungen in der Form der Chondriosomen und Leukoplasten (vgl. Biebl 1942 a, b, Biebl und Url 1958, Biebl, Url, Janeček 1961).

Die UV-Transmission der verwendeten Lösungen wurde mit einem Beckmann-Spektralphotometer bestimmt, und zwar stets im Vergleich zu einer mit dest. H₂O gefüllten Quarzküvette.

In den Fällen, in denen die UV-Transmission der Zwiebelepidermen selbst gemessen wurde, wurden lange Epidermisstreifen im feuchten Zu-

stand im Innern der leeren Spektrophotometer-Küvette an ein Quarzfenster angelegt. Einige Tropfen Wasser am Boden der während der Messung verschlossenen Küvette verhinderten ein Austrocknen.

I. Die Wirkung verschiedener Bereiche kurzwelliger UV-Strahlen

1. Versuche mit Schott-Filtern

Erste orientierende Versuche zur Frage der Wirkung verschiedener Bereiche kurzwelliger UV-Strahlung auf die Pflanzenzelle wurde mit vier handelsüblichen Glasfiltern der Fa. Schott & Gen., Jena, ausgeführt. Ver-

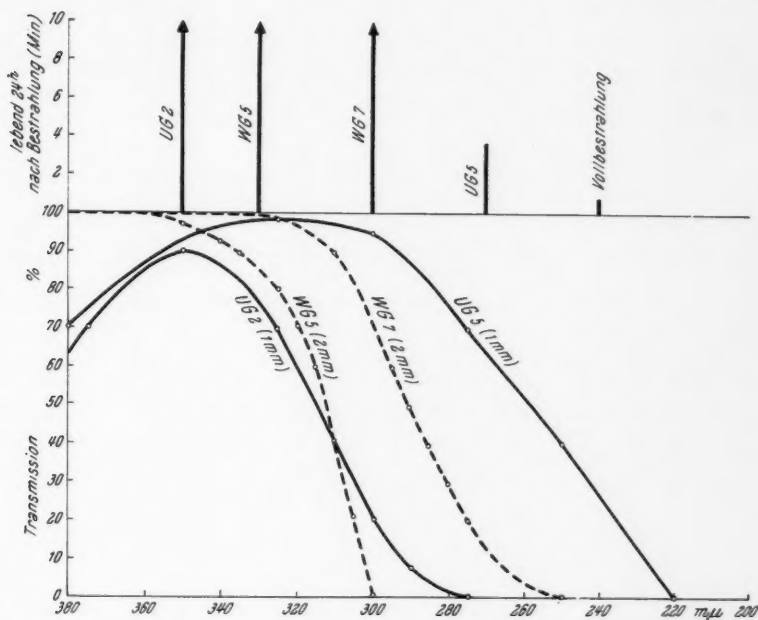


Abb. 1. *Allium cepa*, Innenepidermis. Resistenz unter verschiedenen Schott-Filtern. Unten: UV-Transmission der verwendeten Filter.

wendet wurden die Filter WG₅ (2 mm), WG₇ (2 mm) und die UV-Filter UG₂ (1 mm) und UG₃ (1 mm).

Die Transmissionseigenschaften dieser Filter sowie die Resistenz der von ihnen abgedeckten Zwiebel-Innenepidermen sind in Abb. 1 einander gegenübergestellt. Die rechts von den Transmissionskurven der beiden WG-Filter gelegenen Teile des UV-Spektrums werden von den Filtern absorbiert, die links gelegenen durchgelassen. Die UG-Filter sind im wesentlichen nur für bestimmte Ausschnitte des ultravioletten Lichtes durchlässig, UG₂ nur für den langwelligen Bereich von etwa 280–400 $m\mu$, UG₃ auch noch weiter in den kurzwelligen Spektralbereich, etwa 220–440 $m\mu$.

In dem in Abb. 1 wiedergegebenen Versuch wurden nur Bestrahlungszeiten bis 10 Minuten angewendet. Diese wurden von den unter UG_2 , WG_5 und WG_7 bestrahlten Zellen, bei Beobachtung 24 Stunden nach der Bestrahlung, durchwegs überlebt. Die Todesgrenze der ungefiltert bestrahlten Kontrollen lag bei 1 Minute Bestrahlungsdauer, während die Zellen unter dem UG_5 -Filter bis zu einer Bestrahlungsdauer von 2 Minuten vollständig lebten, nach 4 Minuten Bestrahlung aber teilweise und nach 6 Minuten Bestrahlung zur Gänze getötet waren.

Die Plasmaströmung ließ jedoch schon unter dem WG_7 -Filter einen deutlichen Unterschied zum Verhalten unter WG_5 und UG_2 erkennen. Er ist der Tabelle 1 zu entnehmen. Wie schon früher ausführlich mitgeteilt (Biebl 1942 a, Biebl und Url 1958) und auch von anderen Autoren (Glubrecht 1953) beobachtet, äußert sich schon eine geringfügige UV-Schädigung der Zellen in einer Verlangsamung und schließlich einem Stillstand der Plasmaströmung. Während nun die Plasmaströmung nach Bestrahlung noch ebenso stark war wie in unbestrahlten Kontrollen, war sie unter dem WG_7 -Filter nur nach 2 Minuten Bestrahlung als normal zu bezeichnen. Nach 4 Minuten Bestrahlung war sie schon äußerst verlangsamt, und ab 6 Minuten Bestrahlung war fast nur mehr Brownsche Molekularbewegung (BMB) im Cytoplasma wahrzunehmen. Entsprechend der stärkeren Schädigung bei Bestrahlung durch das UG_5 -Filter trat dort die Hemmung der Plasmaströmung schon ab einer Bestrahlungsdauer von $\frac{1}{4}$ Minute ein. Nach 1 Minute Bestrahlung war sie schon äußerst verlangsamt und nach 2 Minuten Bestrahlung wurde sie bereits von kurzen Glitschbewegungen und BMB abgelöst. Bei den direkt bestrahlten Kontrollen war die Plasmaströmung schon nach $\frac{1}{4}$ Minute Bestrahlung vollständig sistiert.

Tab. 1. *Allium cepa*, Innenepidermis. Lebenszustand nach verschieden langer Vollbestrahlung (Kontrolle) und Bestrahlung durch verschiedene Schott-Filter. Beobachtung 24 Stunden nach der Bestrahlung.

1'' = beste Plasmaströmung, 1' = gute Plasmaströmung, 1 = sehr schwache Plasmaströmung, 1(-) = Glitschbewegungen bis BMB, l = lebend, ± = teilweise tot, + = tot.

Filter	Bestrahlungsdauer (Minuten)							
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	1	2	4	6	8	10
Voll bestrahlte Kontrolle	1	1	+	+	+	+	+	+
WG_5	1''	1''	1''	1''	1''	1''	1''	1''
WG_7	1''	1''	1''	1''	1'	1(-)	1(-)	1(-)
UG_2	1''	1''	1''	1''	1''	1''	1''	1''
UG_5	1(-)	1(-)	1	1(-)	±	+	+	+

Nicht minder deutlich äußert sich die subletale Strahlenwirkung unter dem WG_7 - und dem UG_5 -Filter im Plasmolyseverhalten. Die vorangegangenen Untersuchungen hatten gezeigt, daß sich die subletale Wirkung einer Bestrahlung mit kurzwelligem UV ($< 310 m\mu$) in den Zellen der Zwiebel-Innenepidermis in einem schnelleren Plasmolyseeintritt (erhöhte Wasserpermeabilität) und in einer schnelleren Rundung der Protoplasten

(herabgesetzte Viskosität bzw. Verminderung des Haftvermögens des Protoplasmas an der Zellwand) ausdrückt.

Abb. 2 zeigt Dunkelfeldaufnahmen eines Schnittes, der bei der Bestrahlung links durch ein WG_5 -Filter und rechts durch ein WG_7 -Filter abgedeckt war, während in dem unbedeckten Mittelteil die volle Strahlung des Quarzbrenners auftreten konnte. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde der Schnitt in 1,5 mol Glyzerin plasmolysiert. Unter WG_5 und bei direkter Bestrahlung zeigt sich das gewohnte Bild: unter WG_5 ein langsames und zäheres Lösen des Protoplasten, der sich erst nach langer Zeit zu runden beginnt, im direkt bestrahlten Teil hingegen ein schneller Plasmolyseeintritt

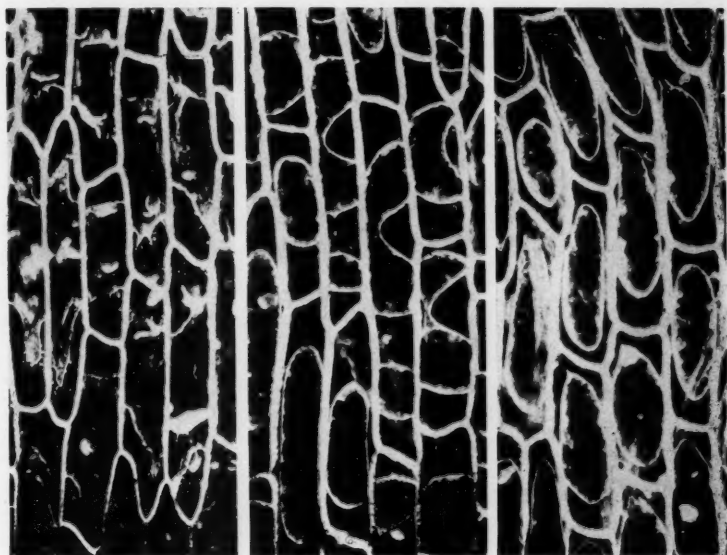


Abb. 2. *Allium cepa*, Innenepidermis. Links durch WG_5 , Mitte direkt, rechts durch WG_7 , eine halbe Minute lang UV-bestrahlt. 24 Stunden später in 1,5 mol Glyzerin plasmolysiert.

mit glatten, konkaven Abhebungen, die rasch zu einer bikonvexen Rundung führen. Unter dem WG_7 -Filter ist nun bereits die gleiche Tendenz zu erkennen. Die Plasmolyse tritt rascher ein als unter WG_5 und die Protoplaste streben von Anfang an zur bikonvexen Plasmolyseform.

Man wird daraus schließen dürfen, daß schon die Wellenlängen zwischen den Transmissionsgrenzen des WG_5 und WG_7 , die etwa einem Bereich von 260 bis 310 m μ entsprechen, jene Wirkungen auf das Protoplasma ausüben, die zu einer Erhöhung der Wasserpermeabilität und zu einer Verringerung der Viskosität bzw. einer Herabsetzung des Haftvermögens des Protoplasmas führt.

Abb. 3 bringt Bilder eines Versuchs, in dem ein Zwiebelepidermisschnitt



Abb. 3. *Allium cepa*, Innenepidermis. Links durch WG_5 , Mitte direkt und rechts durch UG_5 eine halbe Minute lang bestrahlt. 24 Stunden später in 1,5 mol Glycerin plasmolysiert.



Abb. 4. *Allium cepa*, Innenepidermis. Wie Abb. 3, aber 2 Minuten lang bestrahlt.

im linken Drittel durch ein WG_5 -Filter und im rechten durch ein UG_5 -Filter bestrahlt worden war, während der mittlere Teil wieder die volle Strahlung erhielt. Hier ist die schnellere und stärkere Plasmolyse im voll bestrahlten Teil (Mitte) besonders deutlich, aber auch die durch das UG_5 -Filter bestrahlten Zellen (rechts) zeigen wesentlich stärkere und vor allem gerundete Plasmolyseformen als die von dem WG_5 -Filter bedeckt gewesenen Zellen (links).

Daß durch längere Bestrahlung (2 Minuten) auch unter dem UG_5 -Filter Plasmolysegrade und Plasmolyseformen erreicht werden, die jenen nach einer halben Minute direkter Bestrahlung vollkommen entsprechen, zeigt Abb. 4. Die Aufnahmen lassen unter WG_5 (links) die gleich zähzipfeligen

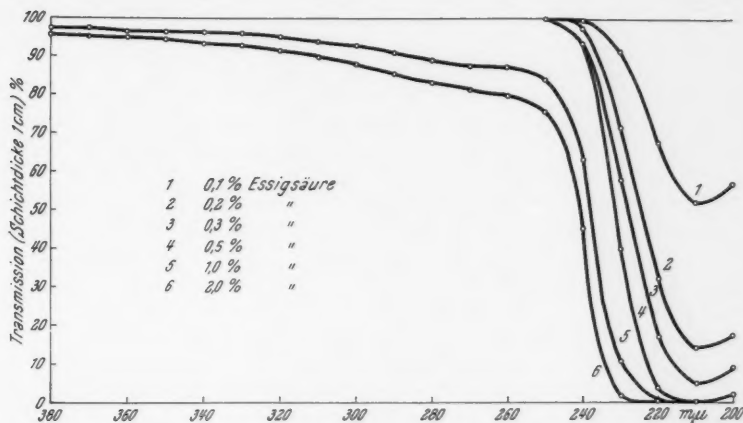


Abb. 5. Transmissionskurven verschiedener Essigsäurekonzentrationen.

Plasmolyseformen erkennen wie nach einer halben Minute Bestrahlung. Die direkt bestrahlten Zellen des mittleren Teiles sind nunmehr schon vollständig abgestorben. Die Zellkerne sind geschrumpft und treten deutlich konturiert hervor. Unter dem UG_5 -Filter (rechts) finden sich aber jetzt Plasmolyseformen, die vollständig jenen gleichen, wie sie mit der ungefilterten Gesamtstrahlung des Quarzbrenners schon nach einer halben Minute Bestrahlung erzielt wurden (vgl. Abb. 3).

2. Versuche mit Küvetten-Filtern

a) Resistenzgrenzen

Als Vorversuch wurden Zwiebel-Innenepidermen zur Hälfte mit der leeren, 1 cm tiefen Quarzküvette abgedeckt und in einer Bestrahlungsreihe die Resistenzgrenzen in der abgedeckten und der bestrahlten Schnitthälfte bestimmt. Es zeigten sich keine Unterschiede. Die Lebensgrenze lag einheitlich bei $\frac{3}{4}$ Minuten Bestrahlung. 1 Minute Bestrahlung führte in beiden Fällen zum Tod der Zellen.

Im folgenden wurde nun die Quarzküvette in 1 cm tiefer Schicht mit den verschiedenen Versuchslösungen gefüllt und so als Filter benützt.

Altbekannt ist die Verwendung von 2%iger Essigsäure zur Abfiltrierung der UV-Strahlen kürzer als etwa $240\text{ m}\mu$. Es wurde daher auch diese in die Versuchsreihen mit einbezogen. Darüber hinaus wurden mit dem Beckmann Spektralphotometer auch die Durchlässigkeitskurven für schwächere Essigsäurekonzentrationen bestimmt. Von ihnen verdient besonders die 0,5%ige Essigsäure Beachtung, die zwischen $250\text{ m}\mu$ und $220\text{ m}\mu$ einen steilen Abfall ihrer Transmission von 95% auf 3% zeigt und sich somit als vorzügliches Stufenfilter erweist, dessen Transmission noch etwa $10\text{ m}\mu$ weiter in den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums reicht als die 2%ige Essigsäure. Die noch stärkeren Verdünnungen schneiden die kurzwelligen Strahlen nicht mehr vollständig ab, sondern werden in zunehmendem Maß auch für diese durchlässig (Abb. 5).

Als eine Filterflüssigkeit, deren Transmissionskurve erst zwischen $230\text{ m}\mu$ und $210\text{ m}\mu$ steil von 85% auf 3% abfällt und damit die Durchlässigkeit der 0,5%igen Essigsäure noch einmal um etwa $10\text{ m}\mu$ nach den kurzwelligen Bereich hin übertrifft, konnte 0,1 mol Semicarbazid-HCl in 1 cm dicker Schicht festgestellt werden.

Von den auf ihre Schutzwirkung zu prüfenden Substanzen wurden für die 1 cm tiefe Quarzküvette zumeist Konzentrationen von 10^{-4} mol bis $5 \cdot 10^{-4}$ mol verwendet, was einer $10\text{ }\mu$ dicken Schichte von 0,1 bis 0,5 mol entspricht. Für Thioharnstoff hat sich nämlich gezeigt (Biebl, Url, Janeček 1961), daß die UV-Absorptionen so dünner Flüssigkeitsschichten etwa den durch Vorbehandlung der Zwiebelepidermen mit diesen Konzentrationen zu erzielenden Schutzwirkungen entsprechen.

Abb. 6 zeigt das Ergebnis von Küvettenfilter-Versuchen, in denen Filterflüssigkeiten verwendet wurden, deren Transmission sich abgestuft immer weiter in den kurzwelligen Bereich der UV-Strahlung erstreckte.

Eine 1 cm dicke Flüssigkeitsschicht von 10^{-4} mol Semicarbazid-HCl und 10^{-4} mol Harnstoff, die nur einen ganz geringen Teil der kürzestwelligen UV-Strahlen absorbieren, haben gegenüber der ungefiltert bestrahlten Kontrolle praktisch keinerlei Schutzwirkung. Hingegen wird eine solche bei Verwendung von 0,1 mol Semicarbazid-HCl, das nur die kürzestwelligen Strahlen unterhalb von etwa $220\text{ m}\mu$ absorbiert, bereits deutlich. Die für die ungefiltert bestrahlte Kontrolle letale Bestrahlungszeit hat sich schon auf mehr als das Doppelte erhöht. Ein Filter aus 0,5%iger Essigsäure läßt die Resistenz bis zur 4fachen, 2%ige Essigsäure bis zur 6fachen, $5 \cdot 10^{-4}$ mol Thioharnstoff bis zur 9fachen und $2 \cdot 10^{-4}$ mol Tetramethylthioharnstoff bis zur 15fachen Letaldosis der unter dest. H_2O bestrahlten Zellen ansteigen. WG₅, dessen Durchlässigkeitsgrenze im Mittel bei $310\text{ m}\mu$ gelegen ist, schützte die durch dieses Glasfilter bestrahlten Zellen bis zur längsten verwendeten Bestrahlungsdauer von 25 Minuten, was der 25fachen Letaldosis der ungefiltert bestrahlten Kontrollen entspricht.

Es ergibt sich somit eine gleichmäßig gegen den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums zunehmende Schadwirkung.

Besonderes Interesse verdienen die Resistenzgrenzen unter 10^{-4} mol

Thioharnstoff und unter 10^{-4} mol Tetramethylthioharnstoff. Sie scheinen aus der gleichmäßig gegen den langwelligen Bereich des UV-Spektrums ansteigenden Resistenzreihe herauszufallen. Ein Blick auf ihre Transmissionskurven (Abb. 6, unten) gibt die Erklärung: Beide zeigen unterhalb $230\text{ m}\mu$ noch einmal einen Anstieg der Strahlendurchlässigkeit, und dieser

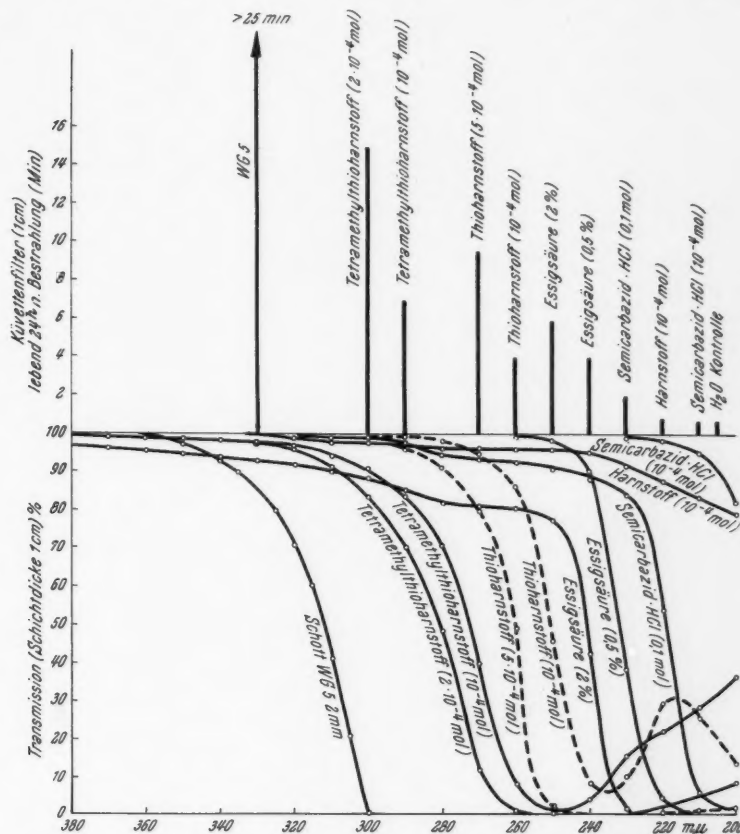


Abb. 6. Lebensgrenzen von Zwiebel-Innenepidermen, die durch verschiedene Küvettenfilter und durch WG_5 UV-bestrahlt wurden. Unten: Transmissionskurven der Filterflüssigkeiten und des Schott- WG_5 -Filters.

reicht offensichtlich aus, um die Resistenzgrenze der Zwiebelzellen so merklich herabzusetzen.

Noch schöner konnte diese starke Wirksamkeit des kurzwelligen UV bei Verwendung von 10^{-4} mol Thioazetamid und von 10^{-4} mol N-Azetylthioharnstoff als Filterflüssigkeit festgestellt werden. Diese beiden Lösungen

zeigen einerseits eine steilabfallende Transmission zwischen etwa 280 und 240 $m\mu$, andererseits aber einen zweiten sehr starken Transmissionsbereich zwischen etwa 240 und 220 (bzw. 210) $m\mu$. Ihre Transmissionskurven sowie ihre Filterwirkungen auf die Zwiebelzellen sind in Abb. 7 jenen von 0,1 und 10^{-4} mol Thioglyzerin sowie von 0,5%iger Essigsäure gegenübergestellt.

Die in Abb. 7 wiedergegebenen Versuche sind mit Epidermen ein und

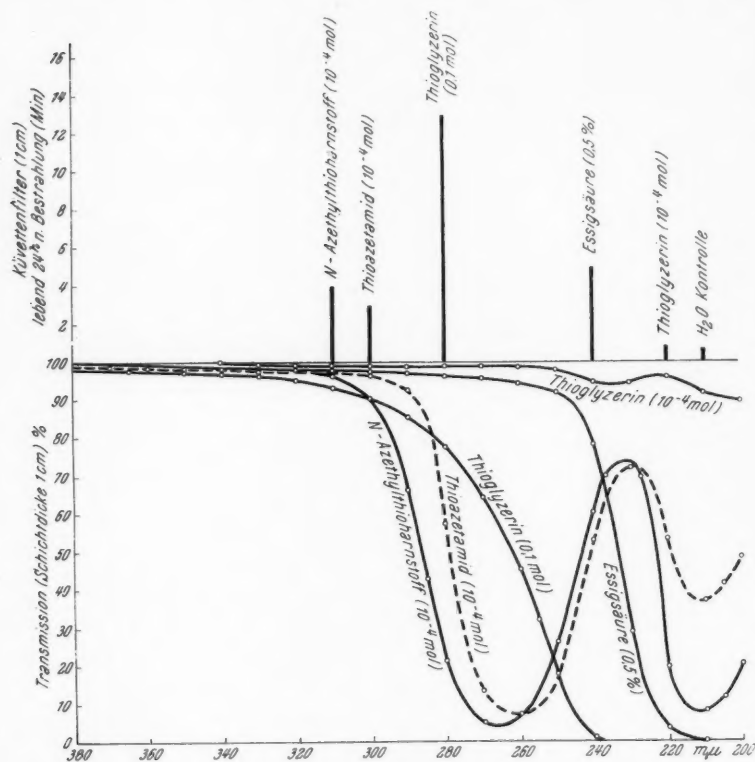
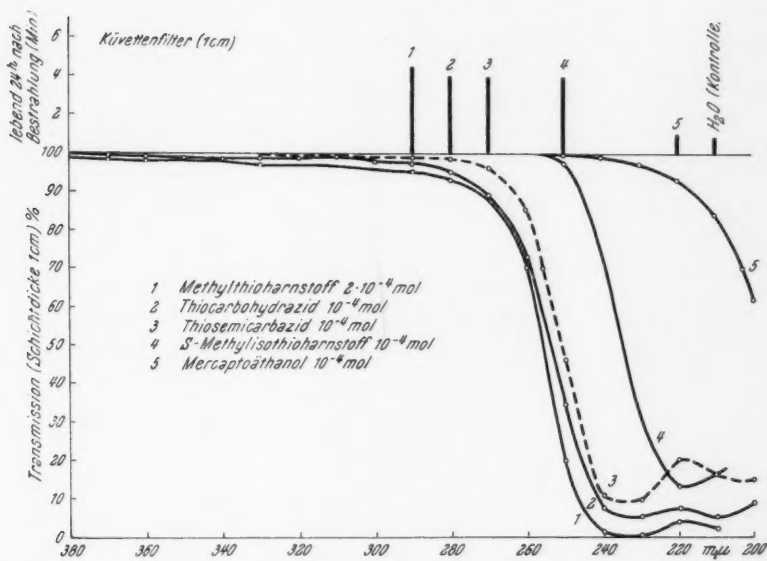
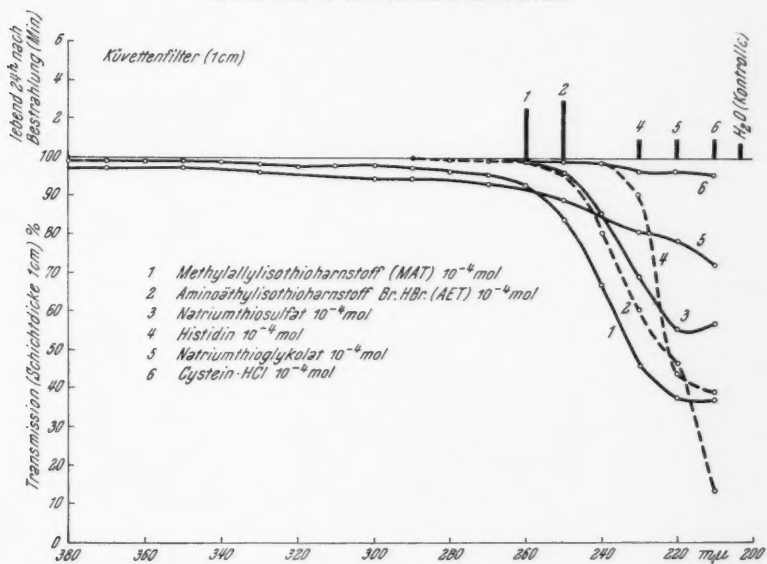


Abb. 7. *Allium cepa*, Innenepidermis, UV-Schutz unter verschiedenen Filterlösungen und deren Transmissionskurven.

derselben Zwiebel ausgeführt und somit streng vergleichbar. Der gegenüber der ungefiltert bestrahlten Kontrolle um ein klein wenig bessere Lebenszustand der unter 10^{-4} mol Thioglyzerin bestrahlten Zellen kann entweder schon auf die geringfügige Absorption oder aber auch auf geringe Reflexionsverluste an der Quarzküvette zurückgehen. Das 0,5%ige Essigsäure-Filter schützte die darunter bestrahlten Epidermen schon bis zur


 Abb. 8. *Allium cepa*, Innenepidermis. UV-Schutz unter verschiedenen Filterflüssigkeiten und deren Transmissionskurven.

 Abb. 9. *Allium cepa*, Innenepidermis. UV-Schutz unter verschiedenen Filterflüssigkeiten und deren Transmissionskurven.

5fachen und 0,1 mol Thioglyzerin bis zur 13fachen der für die ungefiltert bestrahlten Kontrollen letalen Bestrahlungsdauer.

Unter 10^{-4} mol N-Azetylthioharnstoff und unter 10^{-4} mol Thioazetamid, die den Bereich von $280\text{ m}\mu$ bis etwa $245\text{ m}\mu$ fast vollständig absorbieren, liegen die tödlichen Bestrahlungszeiten hingegen schon bei der 4fachen bzw. 5fachen letalen Bestrahlungszeit der direkt bestrahlten Zellen, also niedriger als unter 0,5%iger Essigsäure. Die Transmissionskurven geben wieder die Erklärung: Beide Lösungen haben ein zweites Maximum der Durch-

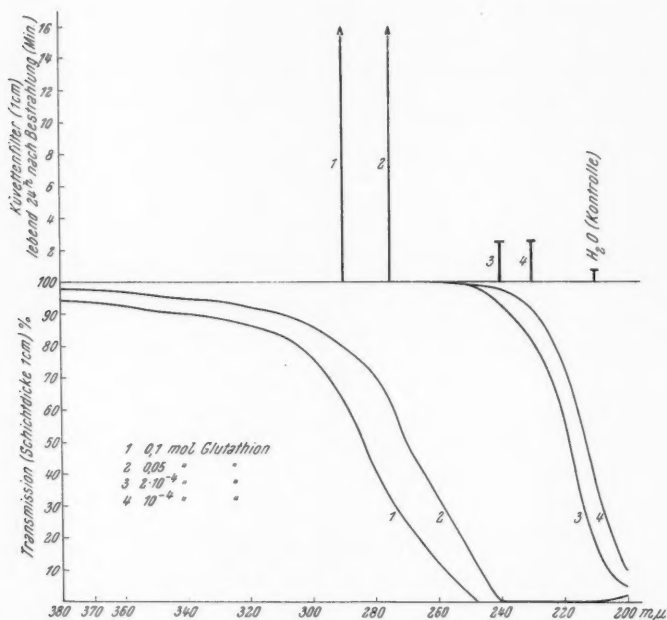


Abb. 10. *Allium cepa*, Innenepidermis. UV-Schutz unter verschiedenen Konzentrationen von Glutathion und deren Transmissionskurven.

lässigkeit im kurzwelligen Bereich der UV-Strahlung und lassen hier noch einen beträchtlichen Anteil kürzerwelliger Strahlen durch als die Essigsäure.

Wie sehr die schädigende Wirkung mit dem Anteil der kürzestwelligen UV-Strahlen zunimmt, ergibt sich schon aus dem Unterschied, der auch noch in der Filterwirkung von N-Azetylthioharnstoff und Thioazetamid besteht. Thioazetamid bietet einen merklich geringeren Absorptionsschutz, da seine Durchlässigkeit im Bereich um $210\text{ m}\mu$ noch um etwa 30% größer ist als die des N-Azetylthioharnstoffes.

Die Abbildungen 8, 9 und 10 bringen entsprechende Versuche mit einigen weiteren Substanzen und können für sich selbst sprechen.

b) Wirkung subletaler Bestrahlungen mit verschiedenen UV-Bereichen auf das Protoplasma

Der Punkt 14 der Zusammenfassung unserer vorangegangenen Thioharnstoffarbeit lautete: „Die nach subletaler Bestrahlung an nicht vorbehandelten Zwiebel-Innenepidermiszellen besonders deutlich zu beobachtende Erhöhung der Wasserpermeabilität und bei Dauerwässerung nach der Bestrahlung eintretende Exsmose von Zellsaftstoffen sowie die Hemmung der Glycerinpermeabilität in den Außenepidermen der Zwiebel-schuppen wird durch die Thioharnstoff-Vorbehandlung nicht beeinflusst.“

Trotz Verlängerung der letalen Bestrahlungsdauer auf das Drei- bis Vierfache treten die erwähnten Permeabilitätsänderungen auch bei den mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten nach gleich kurzen Bestrahlungszeiten auf wie bei den nicht vorbehandelten Kontrollen. Auch die Abrundung der Chondriosomen und Leukoplasten erfolgt nach gleich kurzen Bestrahlungszeiten wie bei den unbehandelten Kontrollen.

Dies führt zu der Annahme, daß es sich hier um eine völlig anders gear- tete Strahlenwirkung handelt als bei jener, die zum Zelltod führt.“

Die Küvettenversuche mit den verschiedenen absorbierenden Filter- flüssigkeiten waren nun bestens geeignet, auch diese Frage des Einflusses der verschiedenen UV-Bereiche auf das Protoplasma und seine Inhaltskörper näher zu untersuchen.

Abb. 11 zeigt die Wirkung einer auch bei direkter Bestrahlung noch subletalen Bestrahlungsdauer von $\frac{1}{2}$ Minute auf Plasmolyseeintritt und Plasmolyseform der Innenepidermen von Zwiebelschuppen von *Allium cepa*. Quer zur Zwiebelschuppe geschnittene Innenepidermisstreifen (wegen möglicher physiologischer Verschiedenheiten der Zellen zwischen Basis und Spitze der Zwiebelschuppen) wurden bei diesen Versuchen links zu einem Drittel mit einem WG₅-Filter und rechts zu einem Drittel mit dem auf seine Wirkung zu prüfenden Küvettenfilter abgedeckt, während das mittlere Drittel als Kontrolle der vollen Strahlung ausgesetzt wurde. Die Transmissionseigenschaften der verwendeten Filterflüssigkeiten sind den Abbildungen 6 und 7 zu entnehmen.

Die direkt (ungefiltert) bestrahlten mittleren Teile der einzelnen Schnitte zeigten gegenüber dem von WG₅ während der Bestrahlung bedeckt gewesenen Teilen, wie altbekannt (Biebl 1942 b), stets einen um 10–50 Sekunden früheren Plasmolyseeintritt und eine schneller Rundung der Protoplaste (d. h. Erhöhung der Wasserpermeabilität und Herabsetzung der Viskosität bzw. des Haftvermögens des Protoplasmas). Der Plasmolyseverlauf unter WG₅ entspricht dabei jenem in völlig unbestrahlten Kontrollen.

Unter der Tetramethylthioharnstoff-Küvette war das Verhalten gleich dem unter WG₅. Das heißt, die Wellenlängen der für die in Frage stehenden Erscheinungen maßgebenden UV-Strahlen muß noch unter etwa 280 m μ gelegen sein. Unter Thioharnstoff, Essigsäure und Semicarbazid war der Plasmolyseverlauf hingegen der gleiche wie bei direkter ungefilterter Be- strahlung. Unter N-Azetylthioharnstoff und auch unter Thioazetamid glichen

jedoch Plasmolyseverlauf und Plasmolyseformen wieder vollständig jenen unter WG_5 bzw. Tetramethylthioharnstoff.

Trotz der infolge starker Durchlässigkeit im kurzwelligen Bereich geringen Filterschutzwirkung des N-Azetylthioharnstoffes und des Thioazetamids gegen letale Dosen (vgl. Abb. 7) verhindert die hohe Absorption im Bereich zwischen etwa $280\text{ m}\mu$ und $240\text{ m}\mu$ bei Anwendung subletaler Dosen die Wirkung auf den Plasmolyseverlauf.

Für die besondere Wirksamkeit dieses Wellenbereiches auf die Permeabilitätseigenschaften des Protoplasmas sprechen auch einige unveröffent-

Filterflüssigkeit	abgedeckt (WG_5)	direkt bestrahlt	Küvettenfilter
Tetramethylthioharnstoff ($2 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$)			
Thioharnstoff ($5 \cdot 10^{-4}\text{ mol}$)			
Essigsäure (2%)			
Essigsäure (0,5%)			
Semicarbazid-HCl (0,1 mol)			
N-Azetylthioharnstoff (10^{-4} mol)			
Thioazetamid (10^{-4} mol)			

Abb. 11. *Allium cepa*. Innenepidermis. $\frac{1}{2}$ Minute UV-bestrahlt (auch bei direkter Bestrahlung subletal). 24 Stunden später: Plasmolyseformen nach 4 bis 6 Minuten in 1,5 mol Glycerin.

lichte, orientierende Versuche, die einer von uns (Biebl) an einem großen UV-Monochromator (Fluke und Setlow 1953) am Brookhaven National Laboratory (USA) auszuführen Gelegenheit hatte. Zwiebel-Innenepidermen wurden in gleicher Weise wie in unseren Versuchen im mittleren Drittel mit den Wellenlängen $289\text{ m}\mu$, $265\text{ m}\mu$, $259\text{ m}\mu$ und $253,7\text{ m}\mu$ 5–60 Minuten lang bestrahlt, während die beiden Schnittenden abgedeckt als Kontrollen dienten. Etwa 4 Stunden nach der Bestrahlung wurde in 0,8 mol KCl plasmolysiert. In den meisten Fällen trat in den bestrahlten Teilen die Plas-

molyse um 30–60 Sekunden früher ein als in den abgedeckten. In allen Fällen war aber nach einigen Minuten die Plasmolyseform in den bestrahlten Teilen bikonvex, in den abgedeckten zipfelig-konkav. Im folgenden sind die eingestrahnten Intensitäten der verwendeten Wellenlängen des UV-Monochromators angegeben²:

Wellenlänge mμ	Photostrom	Bestrahlungs- dauer Minuten	Eingestrahlte Energie
289	1.4(2)μa	20	700 erg/cm ² /sec = × 1200 Sek. = 8.4×10^5 erg/cm ²
265	0.7	20	650 erg/cm ² /sec = × 1200 Sek. = 7.8×10^5 erg/cm ²
259	0.45	20	440 erg/cm ² /sec = × 1200 Sek. = 5.3×10^5 erg/cm ²
253.7	0.027	60	28 erg/cm ² /sec = × 3600 Sek. = 1.0×10^5 erg/cm ²

Für eine besondere Wirkung dieses UV-Bereiches auf das Protoplasma sprechen aber auch noch weitere Beobachtungen. In vorangegangenen Arbei-

Tab. 2. *Allium cepa*. Innenepidermis. Plasmaströmung und Organellenform 24 Stunden nach einer innerhalb dieser Zeit subletalen UV-Bestrahlung von $\frac{1}{2}$ Minute. a Plasmaströmung: 1(-) gut, 1+ sehr schwach, 1(-) Glitschbewegung bis BMB; b Chondriosomen: lg stäbchen- bis schlangenförmig, rd kurz bis vollkommen rund; c Leukoplasten: am amöboid, rd abgerundet.

Filterflüssigkeit	abgedeckt (WG ₅)			direkt bestrahlt			Küvettenfilter		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Tetramethylthioharnstoff									
2 · 10 ⁻⁴ mol	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1(-)	lg	am
Thioharnstoff									
5 · 10 ⁻⁴ mol	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1+	rd	rd
Essigsäure 2%	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1+	rd	rd
Essigsäure 0,5%	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1+	rd	rd
Semicarbazid 0,1 mol	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1+	rd	rd
N-Azetylthioharnstoff									
10 ⁻⁴ mol	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1(-)	lg	am
Thioazetamid 10 ⁻⁴ mol ..	1(-)	lg	am	1(-)	rd	rd	1(-)	lg	am

ten (Biebl und Uri 1958, Biebl, Uri, Janeček 1961) wurde die Wirkung subletaler UV-Bestrahlungen auf die Form der Chondriosomen und Leukoplasten der Zwiebel-Innenepidermen beschrieben. Die Wirkung auf die Plasmaströmung ist schon länger bekannt (Biebl 1942 a, Glubrecht 1953). Tab. 2 gibt den Grad der Plasmaströmung sowie das Aussehen der Chondriosomen und Leukoplasten in dem in Abb. 11 hinsichtlich der Plasmolyseformen dargestellten Versuch wieder. Beobachtet wurde wie dort 24 Stunden nach $\frac{1}{2}$ Minuten langer Bestrahlung. Zwischen den durch WG₅ abgedeckten Schnitteilen und vollkommen unbestrahlten Kontrollen bestand auch hier kein Unterschied. Das Licht des Quarzbrenners länger als 310 mμ

² Für die Unterstützung bei der Bestrahlung und die Berechnung der Intensitäten bin ich Herrn Dr. D. J. Fluke, Brookhaven, zu herzlichem Dank verpflichtet.

hatte demnach keinen Einfluß auf die in Frage stehenden zytomorphologischen Veränderungen.

Die unbestrahlten Kontrollen sowie die durch WG_3 bestrahlten Schnitte zeigten durchwegs gute Plasmaströmung, die Chondriosomen hatten nach 24 Stunden Wässerung zum Teil lange, dünne, sich flexibel im strömenden Plasma schlängelnde Formen angenommen, die Leukoplasten besaßen amöboid veränderliche, ein-, zwei- oder dreiseitig ausgezipfelte Formen.

In den direkt, ohne Filterung bestrahlten Schnittteilen war die Plasmaströmung sistiert, die Kleininhaltskörper des Cytoplasmas, vor allem die Sphärosomen, zeigten höchstens noch kurzstreckige Glitschbewegungen oder nur mehr BMB. Die Chondriosomen waren verkürzt und gerundet. Die Leukoplasten hatten ihre Fortsätze eingezogen und waren zu runden oder ovalen Gebilden geworden.

Unter den verschiedenen Küvettenfiltern waren die Strahlenwirkungen verschieden. Unter Tetramethylthioharnstoff war wie beim Plasmolyseverlauf kein Unterschied zur abgedeckten Kontrolle zu sehen. Unter Thioharnstoff, Essigsäure und Semicarbazid war die Auswirkung der Bestrahlung auf die Form der Chondriosomen und Leukoplasten gleich wie nach direkter Bestrahlung, während unter der N-Azetylthioharnstoff- und der Thioacetamid-Küvette wiederum kein Unterschied zu der mit WG_3 abgedeckten Kontrolle festzustellen war.

Es weist dies darauf hin, daß der von den beiden letztgenannten Filterflüssigkeiten weitgehend absorbierte Wellenbereich zwischen $240 m\mu$ und $280 m\mu$ ebenso wie für den Plasmolyseverlauf der Zwiebelzellen auch für das Zustandekommen der erwähnten zytomorphologischen Veränderungen verantwortlich ist.

Die gleiche Tendenz, wenn auch nicht so klar ausgeprägt, ließ sich bei Beobachtung der Glyzerinpermeabilität der äußeren, morphologisch unteren Zwiebelschuppen-Epidermis sowohl bei roten wie bei gelben Zwiebeln erkennen. Die Hemmung der Glyzerinpermeabilität unter Einwirkung von UV-Strahlen kürzer als $310 m\mu$ gehört zu den auffallendsten und jederzeit reproduzierbaren subletalen Bestrahlungseffekten (Biebl 1942 b, Toth 1949). Werden zur Hälfte mit einem WG_3 -Filter abgedeckte Außenepidermen einer Zwiebelschuppe mit einer innerhalb von 24 Stunden subletalen UV-Dosis (z. B. 2–3 Minuten) bestrahlt und 24 Stunden nach der Bestrahlung in eine 1,0 mol. Glycerinlösung eingelegt, so tritt mehr oder weniger gleichmäßig in beiden Schnitthälften Plasmolyse ein. Während diese aber in der durch das WG_3 bestrahlten Hälfte im Verlauf von 1–2 Stunden infolge Glycerineintrittes in die Vakuolen vollständig zurückgeht, bleibt sie in der vollbestrahlten Hälfte stundenlang in bikonvexer Form erhalten (vgl. Abb. 10 in Biebl, Url, Janeček 1961). Die Glyzerinpermeabilität ist hier stark gehemmt.

In unseren Küvettenfilter-Versuchen wurde jeder Schnitt, wie vorhin die Innenepidermen, von der einen Schmalseite her mit einem WG_3 -Filter, von der anderen mit einem der verschiedenen Küvettenfiltern abgedeckt, während die Mitte wieder der vollen UV-Bestrahlung ausgesetzt wurde. 24 Stunden später wurden die Schnitte in 1,0 mol Glycerin eingelegt. Nach 2 Stun-

den zeigte sich das gewohnte Bild: das durch WG_3 abgedeckte Schnittdrittel war vollständig deplasmolysiert, das voll bestrahlte Mittelstück zeigte durchwegs starke bikonvexe Plasmolysen.

In den durch die Küvettenfilter bestrahlten Schnitteilen waren die Bilder unterschiedlich, zeigten aber keine so klare Wellenlängenabhängigkeit wie der Plasmolyseverlauf und die Organellenformen in den Zellen der Zwiebelinnenepidermis. Tab. 3 bringt das Ergebnis eines Versuches mit je zwei Außenepidermis-Schnitten (a, b) einer roten Zwiebel.

Tab. 3. *Allium cepa*, rote Außenepidermis einer Zwiebelschuppe. Hemmung der Glycerinpermeabilität 24 Stunden nach 2 Minuten UV-Bestrahlung. Beobachtet 2 Stunden nach Einlegen in 1,0 mol Glycerin.

Filterflüssigkeit	abgedeckt (WG_3)	direkt bestrahlt	Küvettenfilter
Tetramethylthioharnstoff $2 \cdot 10^{-4}$ mol ...	deplasmolysiert	bikonvex	a) 85–90 % depl. b) 90% depl.
Thioharnstoff $5 \cdot 10^{-4}$ mol	depl.	bikonvex	a) 15% depl. b) 3% depl.
Essigsäure 2%	depl.	bikonvex	a) 95% depl. b) 85% depl.
Essigsäure 0,5%	depl.	bikonvex	a) 25% depl. b) 70% depl.
Semicarbazid 0,1 mol	depl.	bikonvex	a) 50% depl. b) 75% depl.
N-Azetylthioharnstoff 10^{-4} mol	depl.	bikonvex	a) 100% depl. b) 97% depl.
Thioazetamid 10^{-4} mol	depl.	bikonvex	a) 70% depl. b) 90% depl.

Wenn wir ein übereinstimmendes Verhalten der UV-Strahlen bedingten Permeabilitätshemmung für Glycerin in den Zwiebelaußenepidermen mit den Strahlenwirkungen auf das Plasma der Innenepidermen (vgl. Abb. 11 und Tab. 2) suchen wollen, so erscheint dies für die Küvettenfilter mit Tetramethylthioharnstoff, N-Azetylthioharnstoff und Thioazetamid einigermaßen gegeben. In allen drei Fällen sind die durch die Küvettenfilter bestrahlten Zellen in ihrer überwiegenden Mehrzahl deplasmolysiert und entsprechen damit dem Verhalten unter dem WG_3 -Filter bzw. in vollkommen unbestrahlten Kontrollschnitten. Unter den übrigen Küvettenfiltern wäre jedoch eine größere Ähnlichkeit im Permeabilitätsverhalten mit jenem in den direkt bestrahlten Zellen, d. h. eine gleichmäßigere Permeabilitätshemmung zu erwarten gewesen. Am weitestgehendsten war sie unter dem Thioharnstoff-Filter gegeben. In den übrigen Fällen war stets auch ein hoher Prozentsatz der Zellen deplasmolysiert.

Eine Erklärung dafür mag in der größeren Verschiedenheit der individuellen UV-Resistenz der Zellen der Zwiebel-Außenepidermen gelegen sein. Für diese ist nämlich bei letalen Grenzdosen stets ein „scheckiges“ Absterben charakteristisch, d. h. es beginnen nicht größere Zellkomplexe gleichmäßig abzusterben, sondern bald hier eine Zelle, bald dort eine.

Genau das gleiche Bild finden wir bei Verwendung sublethaler Bestrahlungszeiten im Hinblick auf die Glycerinpermeabilität. Abb. 12 bringt als

Beispiel einen Ausschnitt aus dem durch das 0,1 mol Semicarbazid-Küvettenfilter abgedeckt gewesenen Schnittteil. 24 Stunden nach 2 Minuten langer Bestrahlung, in 1,0 mol Glycerin eingelegt und 2 Stunden später beobachtet, sehen wir einen Großteil der Zellen deplasmolysiert, aber ungleichmäßig verteilt liegen dazwischen plasmolysierte Zellen, deren Glycerinpermeabilität ebenso gehemmt wurde, wie dies im direkt bestrahlten Teil des Schnittes zu 100% der Fall war (vgl. Tab. 3). Diese Zellen scheinen jenen weniger resistenten Zellen zu entsprechen, die nach stärkerer Bestrahlung zuerst absterben würden.

Ein Vergleichsversuch mit der Außenepidermis einer gelben Zwiebelsorte zeigte ähnliches Verhalten. Auch hier war nach zweistündigem Liegen in

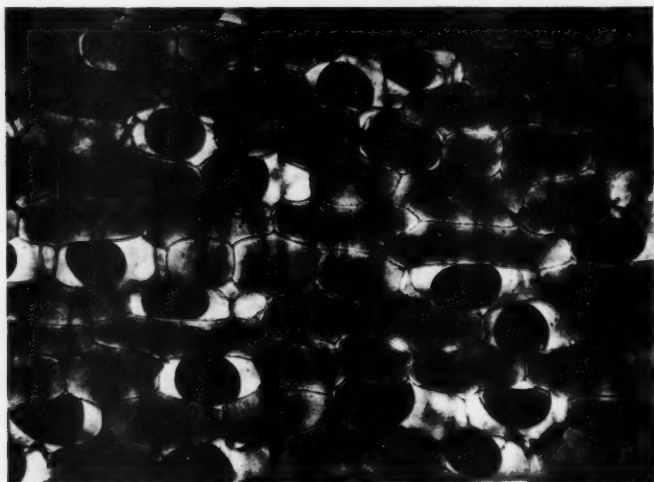


Abb. 12. *Allium cepa*, Außenepidermis. 2 Stunden UV-bestrahlt durch ein 0,1 mol Semicarbazid-Küvettenfilter. 24 Stunden später in 1,0 mol Glycerin und 2 Stunden später photographiert. Unregelmäßig verteilt liegen Zellen, in denen die Permeabilitätshemmung wirksam wurde. Die übrigen Zellen sind deplasmolysiert.

1,0 mol Glycerin in dem durch WG_3 bestrahlten Schnittteil infolge Glycerinpermeation vollständige Deplasmolyse eingetreten, während in den direkt bestrahlten Zellen durchwegs starke bikonvexe Plasmolysen erhalten waren. In den durch die Küvettenfilter bestrahlten Schnittteilen waren jedoch, ähnlich wie bei der roten Zwiebel, in allen Fällen deplasmolysierte und in ihrer Glycerinpermeabilität gehemmte, bikonvex abgehobene Protoplaste nebeneinander zu sehen. Die prozentuellen Anteile der deplasmolysierten und der noch plasmolysierten Zellen ließen unter den verschiedenen Filter ebenfalls keine klaren Gesetzmäßigkeiten erkennen.

Wir beschränkten uns daher in den folgenden „Vorbehandlungs-Versuchen“ ausschließlich auf die weitaus gleichmäßiger reagierenden Zwiebel-Innenepidermen.

II. Schutz durch Vorbehandlung mit den in Küvetten auf ihre physikalische UV-Absorption geprüften Stoffen

Die Küvettenversuche haben ergeben, daß eine klare Beziehung zwischen der letalen Bestrahlungsdauer und den Transmissionseigenschaften der einzelnen Filterflüssigkeiten besteht. Je weiter sich das Transmissionsvermögen der Filterflüssigkeiten in den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums hinein erstreckt, um so geringer wird ihre schützende Filterwirkung.

Im folgenden sollen nun die Ergebnisse der Küvettenversuche mit der Wirkung einer Vorbehandlung der Schnitte mit den als Filterflüssigkeiten verwendeten Stoffen verglichen werden. Je ähnlicher die Verhältnisse, um so größer die Wahrscheinlichkeit, daß diese Stoffe auch in den Pflanzenzellen durch ihre physikalische UV-Absorption schützen. Mit Sicherheit könnte man nur dann auf einen chemischen Strahlenschutz schließen, wenn eine Substanz, die als Filterflüssigkeit infolge mangelnder UV-Absorption keinen Schutz gewährt, dies nach Vorbehandlung des Schnittes tun würde.

Zur Vorbehandlung wurden die zu prüfenden Stoffe im allgemeinen in Konzentrationen von 0.1 oder 0.2 mol verwendet. Höhere Konzentrationen wurden vermieden, um noch sicher in einem unschädlichen und hypotonischen Konzentrationsbereich zu bleiben. Diese Konzentrationen entsprechen in 10 μ dicker Schicht den in den 1 cm tiefen Quarzküvetten verwendeten Verdünnungen von 10^{-4} bzw. $2 \cdot 10^{-4}$ mol. Nach den Erfahrungen mit Thioharnstoff wurde nämlich angenommen, daß etwa eine dieser Schicht entsprechende Stoffmenge in der Zellwand bzw. im Protoplasma der vorbehandelten Zellen angereichert werden kann. Daß diese Annahme keineswegs für alle Substanzen zutrifft, wird aus den Differenzen zu ersehen sein, die zwischen der Schutzwirkung des Küvettenfilters und jener der Vorbehandlung bestehen.

1. Stoffe ohne wesentliche UV-Absorption

Wurden zur Vorbehandlung der Zwiebel-Innenepidermen Stoffe herangezogen, die in den verwendeten Konzentrationen weder im Spektralphotometer eine wesentliche UV-Absorption zeigten, noch im Küvettenfilter die darunter liegenden Zellen nennenswert zu schützen vermochten, so war nach 30 Minuten Vorbehandlung der Schnitte mit diesen Lösungen auch in keinem Fall eine Schutzwirkung gegenüber den unvorbehandelt, auf Wasser bestrahlten Kontrollen zu beobachten.

Der meist um ein geringes bessere Lebenszustand der Zwiebel-Innenepidermen unter den Küvettenfiltern kann durch schwache Absorptionsverluste oder Reflexion der UV-Strahlen an der Quarzküvette zwanglos erklärt werden. Im wesentlichen liegen aber die Lebensgrenzen für die durch die Küvetten abgedeckten, die vorbehandelten und die unvorbehandelt auf Wasser bestrahlten Schnitte gleich hoch (Abb. 13).

Die in der Literatur als chemisch wirksame Schutzstoffe gegen Röntgen- oder Gamma-Bestrahlungen genannten Substanzen Mercaptoäthanol, Na-thioglykolat und Cystein vermögen demnach den Zwiebel-Innenepidermen gegen kurzwellige UV-Strahlung keinen erkennbaren Schutz zu gewähren. Dem Verhalten dieser Stoffe schließen sich auch Na-

dithionat und Na-thiosulfat an. Durch 30 Minuten lange Vorbehandlung von Zwiebel-Innenepidermen mit $0,17$ molaren Lösungen dieser beiden Stoffe war gegenüber den unvorbehandelt, auf Wasser bestrahlten Kontrollschnitten keine Schutzwirkung zu erzielen. Ebenso wenig war durch Vorbehandlung mit $0,1$ und $0,2$ mol Glutathion ein Schutz zu erreichen.

Ein orientierender Versuch mit Cysteamin zeigte bei Bestrahlung nach 14 Stunden langer Vorbehandlung der Zwiebelzellen mit einer $0,01$ mol Lösung ebenfalls keinerlei Schutzwirkung.

Auch Vorbehandlungen mit $0,1$ mol Histidin blieben ohne Wirkung. Für diese Substanzen wurden in einem Versuch Vorbehandlungszeiten von $\frac{1}{2}$, $1\frac{1}{2}$, $2\frac{1}{2}$ und $6\frac{1}{2}$ Stunden angewendet. Die Lebensgrenzen lagen 24 Stun-

Substanz	Bestrahlungsdauer (Minuten)				
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$	1	$1\frac{1}{2}$
Semicarbazid-HCl 10^{-4} mol 0,1 mol	lebend	lebend	lebend	gestorben	gestorben
Mercaptoäthanol 10^{-4} mol 0,1 mol	lebend	lebend	lebend	gestorben	gestorben
Thioglycerin 10^{-4} mol 0,1 mol	lebend	lebend	lebend	gestorben	gestorben
Na-Thioglycolat 10^{-4} mol 0,1 mol	lebend	lebend	lebend	gestorben	gestorben
Cystein-HCl 10^{-4} mol 0,1 mol	lebend	lebend	lebend	gestorben	gestorben
Na-Thiosulfat 10^{-4} mol 0,1 mol	lebend	lebend	lebend	gestorben	gestorben

Abb. 13. *Allium cepa*. Innenepidermis. Fehlende Schutzwirkung nach Vorbehandlung mit nicht oder nur äußerst schwach UV-absorbierenden Stoffen.

Strichlierte Kästchen: lebend unter Küvettenfilter (10^{-4} mol, 1 cm Schichtdicke).

Leere Kästchen: lebend nach 30 Minuten Vorbehandlung mit $0,1$ mol,

Punktierte Kästchen: lebend nach Bestrahlung auf Wasser (Kontrolle).

den nach der UV-Bestrahlung ebenso wie für die unbehandelten Kontrollen einheitlich bei einer Bestrahlungsdauer von 1 Minute. Ein kleiner Unterschied war nur darin zu sehen, daß die Zellen der unvorbehandelten Kontrolle nach $1\frac{1}{2}$ Minuten Bestrahlung restlos abgestorben waren, während in den mit Histidin vorbehandelten Schnitten stets noch ein kleiner Prozentsatz lebte. In einem anderen Versuch wurde die Vorbehandlungszeit auf 24 Stunden ausgedehnt. In diesem Versuch war die Lebensgrenze in der unvorbehandelten Kontrolle bei $\frac{1}{4}$ Minuten Bestrahlung gelegen, in den

vorbehandelten Schnitten jedoch bei 1 Minute. Im parallel dazu geführten Kuvettenversuch lebten aber die Schnitte auch noch nach 1 Minute Bestrahlung. Es ist daher möglich und sehr wahrscheinlich, daß auch in den vorbehandelten Schnitten die kleine Schutzwirkung auf physikalische Absorption zurückzuführen war.

Die Tatsache, daß nicht oder nur äußerst schwach UV-absorbierende und daher nicht zu einer „konkurrierenden Absorption“ befähigte Stoffe in den vorbehandelten Zwiebelepidermen keinen Schutz gegen UV-Strahlen ausüben, wäre aber noch unzureichend, um die Möglichkeit eines chemischen Strahlenschutzes gegen kurzwellige UV-Strahlen auszuschließen. Sie muß noch ergänzt werden durch die Prüfung, ob die genannten Stoffe überhaupt in die Zelle einzudringen vermögen.

Hinsichtlich der Methoden der Permeabilitätsmessung und Literatur dazu sei auf unsere vorangegangene Arbeit (Biebl, Url, Janeček 1961, S. 336 ff.) verwiesen. Im Prinzip besteht die plasmolytische Permeabilitätsmessung in der Beobachtung der Rückgangsgeschwindigkeit der in einer hypertonischen Lösung des betreffenden Stoffes eingetretenen Plasmolyse infolge allmählichen Stoffeintrittes.

Mercaptoäthanol permeiert, wie alle einwertigen Alkohole (Zehetner 1934, Werth 1961), extrem rasch. Nach Einlegen von Zwiebel-Innenepidermen, deren osmotischer Wert etwa 0,3 mol Glukose entspricht, in 2,0 mol Mercaptoäthanol ist keine Plasmolyse zu beobachten. Mit gleicher Geschwindigkeit, mit der das Wasser entzogen wird, dringt das Mercaptoäthanol in die Zellen ein. Auch wenn man die Zellen zuerst in 0,5 mol Glukose plasmolysiert und dann 2,0 mol Mercaptoäthanol durchsaugt, ist keine weitere Verkleinerung des Protoplasten zu erkennen, sondern die Protoplaste beginnen sich infolge des raschen Eintrittes des Mercaptoäthanol sofort auszudehnen. Meist endet dies nach wenigen Minuten mit einem Platzen der Protoplasten.

Verhältnismäßig gut läßt sich die Permeabilität des Thioglyzerins messen. Auch dieses permeiert so rasch, daß bei direktem Einlegen in 2,0 mol Thioglyzerin nur in einzelnen Randzellen des Schnittes ganz schwache plasmolytische Abhebungen der Protoplasten sichtbar werden, die infolge des raschen Thioglyzerineintrittes schon nach 60–70 Sekunden wieder zurückgehen. In den meisten übrigen Zellen des Schnittes halten sich jedoch Wasserentzug und Thioglyzerineintritt wiederum so die Waage, daß es zu gar keiner Abhebung der Protoplasten kommt.

Immerhin ist die Permeationsgeschwindigkeit des Thioglyzerins gegenüber der des Mercaptoäthanol um so viel langsamer, daß sich eine Messung nach der Deplasmolysezeit-Partialmethode nach Hofmeister (1948, näheres über die Methode bei Biebl, Url, Janeček 1961, S. 338) durchführen läßt. Diese Methode wird vor allem dann angewendet, wenn die auf ihre Permeationsgeschwindigkeit zu prüfenden Stoffe in höheren Konzentrationen schädigend wirken oder sich nicht in hypertonischen Konzentrationen lösen. Im Fall des Thioglyzerins gilt das erstere.

Die Zwiebel-Innenepidermen wurden in eine Mischlösung aus 0,3 mol Glukose und 1,0 mol Thioglyzerin eingebracht. 0,3 mol Glukose entspricht

dem osmotischen Wert der Zellen und ruft für sich allein schwache Grenzplasmolyse hervor. In der Mischlösung trat nun in allen Zellen deutliche Plasmolyse ein, die innerhalb von 20 Minuten infolge Thioglyzerineintritt wieder vollständig zurückgeht. Aus der Formel $\frac{120}{T} (T = \text{Deplasmolysezeit})$ ergibt sich ein Wert für P'_{dp} (= Permeationskonstante im Partialverfahren in einem Deplasmolyseversuch gemessen) von 6,0. Dieser gegenüber dem für *Allium cepa*-Innenepidermen bekannten Glyzerin-Wert von $P' = 0,066$ extrem hohe Wert, läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß hier auch schon eine pathologisch erhöhte Permeabilität mit eine Rolle spielt.

Aber ebensowenig wie mit 0,1 mol (vgl. Abb. 13) ließen sich die Zwiebelepidermen durch Vorbehandlung mit 0,2 mol Thioglyzerin gegen die Wirkung der kurzwelligen UV-Strahlen schützen.

Semicarbazid stand nur in der Form des salzsauren Salzes (Semicarbazid · HCl) zur Verfügung. Konzentrierte Lösungen, wie sie für plasmometrische Permeabilitätsversuche notwendig wären (über 0,5 mol), besitzen extrem niedere pH-Werte (unter pH 2) und sind daher wegen ihrer Schädlichkeit nicht verwendbar. Durch Neutralisieren, z. B. mit NaOH, entsteht aber so viel NaCl, daß schon durch dieses Plasmolyse eintritt, die wegen der weitgehenden Impermeabilität des Plasmas für dissoziierte Salze nicht mehr zurückgeht. Eine möglicherweise sehr rasche Permeation der Semicarbazid-Base ließ sich aber aus methodischen Gründen nicht messen.

Ähnliche Meßschwierigkeiten bestehen für Cystein · HCl, doch ist anzunehmen, daß seine Permeation in die Vakuole wie bei allen Aminosäuren äußerst langsam vor sich geht.

Na-thioglykolat hat in der zur Plasmolyse nötigen Konzentration einen pH-Wert, der so weit im basischen Bereich liegt (pH 10), daß dadurch die Pflanzenzellen geschädigt werden (Höfler 1951, Url 1959). Außerdem würden die im alkalischen Bereich vorhandenen Anionen der Thioglykolsäure nach den bisherigen Erfahrungen sicher nicht zur Permeation fähig sein. Zur Vorbehandlung wurden die Lösungen daher neutralisiert.

Na-dithionat und Na-thiosulfat sind als Salze in der Lösung weitgehend dissoziiert und besitzen als Ionen ebenfalls keine nennenswerte Permeationsfähigkeit.

Histidin permeiert äußerst langsam. Auch sein Permeationsvermögen kann nur mit dem Partialverfahren gemessen werden, und zwar diesmal deshalb, weil auch die gesättigte Lösung (etwa 0,2–0,25 mol) noch hypotonisch ist. Die Zwiebelepidermen wurden daher wieder in eine Mischung aus 0,3 mol Glukose und einer gesättigten Histidinlösung eingelegt. Nach 10 Minuten war in allen Zellen bikonvexe Plasmolyse eingetreten, die nach 3 Stunden noch völlig unverändert war.

Sofern sich Histidin ähnlich wie andere, schon auf ihr Permeationsvermögen untersuchte Aminosäuren (Leucin, Asparagin: Bonte 1934) verhält, liegt seine Permeation in der Größenordnung der Zucker Glukose und Erythrit, ist also äußerst gering. Daß die Aminosäuren aber jedenfalls in geringen Mengen ins Plasma eindringen und in ihm wirksam werden kön-

nen, geht schon aus den Versuchen von Fitting (1929, 1930) über die Auslösung von Plasmaströmung durch Aminosäuren (Chemodinese) hervor.

Glutathion schließlich kann möglicherweise auch in Spuren in das Plasma eindringen bzw. aktiv aufgenommen werden, ist aber als Tripeptid sicher noch weniger als die Aminosäuren zur passiven Permeation befähigt.

Es sei allerdings betont, daß alle plasmolytischen Methoden zur Messung der Plasmapermeabilität den Eintritt eines Stoffes von außen bis in die Zellsaftvakuole erfassen. Für einen chemischen Strahlenschutz würde aber schon ein Eindringen eines Stoffes nur bis in das Cytoplasma selbst genügen. Diese Intrabilität (Höfler 1931) entzieht sich aber der plasmolytischen Messung.

Dieser Blick auf die Permeationseigenschaften der in diesem Abschnitt behandelten Stoffe, die nicht durch physikalische Absorption zu schützen vermögen, zeigt, daß zumindest einzelne von ihnen leicht und rasch in das Plasma und durch dieses in die Vakuole eindringen, so daß sie die Möglichkeit gehabt hätten, einen chemischen Strahlenschutz auszuüben. Das war aber nicht der Fall.

Diese Versuche erscheinen uns daher als ein schwerwiegendes Faktum gegen die Wahrscheinlichkeit eines chemischen Strahlenschutzes bei UV-Bestrahlung und für die Notwendigkeit in allen Fällen, in denen ein solcher vorzuliegen scheint, noch einmal die Möglichkeit einer physikalischen Absorption zu überprüfen.

2. Stoffe mit starker UV-Absorption

Die meisten schwefelhaltigen Harnstoffderivate und einige ihnen verwandte Verbindungen gewähren Zwiebel-Innenepidermiszellen nach 30 Minuten Vorbehandlung in 0,1–0,2 mol. Lösungen einen deutlichen, oft sogar sehr beträchtlichen Schutz gegen die Wirkung nachfolgender Bestrahlung mit kurzwelligem UV.

Alle diese Stoffe besitzen aber ein starkes Absorptionsvermögen für UV-Strahlen. Ihre Transmissionskurven sind den Abbildungen 6–10 zu entnehmen.

a) Schutzwirkungen bei subletaler UV-Bestrahlung

Wie sehr in den Zwiebel-Innenepidermiszellen die Schutzwirkungen nach Vorbehandlung mit jenen nach Abdeckung mit den entsprechenden Küvettenfiltern übereinstimmen und damit auf einen gleichartigen Schutzmechanismus durch physikalische Absorption hinweisen, sei am Beispiel von Schutzversuchen mit 0,1 mol Thioharnstoff und mit 0,1 mol Thioazetamid vorgeführt.

Die Küvettenversuche (S. 280) hatten gezeigt, daß der Strahlenbereich zwischen etwa 280 m μ und 240 m μ als verantwortlich für die Abrundung von Chondriosomen und Leukoplasten in den Zellen der Zwiebel-Innenepidermis anzusehen ist. Unter der Thioharnstoffküvette, die diesen Strahlenbereich zu einem Großteil durchläßt, runden sich die Chondriosomen und Leukoplasten, unter Thioazetamid, das diesen Strahlenbereich weitgehend absorbiert, bleiben sie in ihrer ursprünglichen länglichen bzw. amöboiden Form erhalten.

Dabei ist der Schutzeffekt gegen letale Bestrahlungen unter diesen beiden Flüssigkeitsfiltern meist recht ähnlich. Wenn Unterschiede auftreten, dann sogar in der Richtung, daß unter dem Thioazetamid-Filter die kürzeren letalen Bestrahlungszeiten zu beobachten sind.

Tab. 4 bringt einen Vorbehandlungs-Schutzversuch mit 0,1 mol Thioharnstoff und mit 0,1 mol Thioazetamid, durchgeführt an Innenepidermen ein und derselben Zwiebelnschuppe. Die Ergebnisse sind daher untereinander und mit den zugehörigen, durch WG_5 abgedeckten Schnitthälften, sowie den auf reinem Wasser direkt bestrahlten Kontrollen streng vergleichbar. Wie die Lebensgrenze der Kontrolle bei 1 Minute Bestrahlungsdauer (sonst meist $\frac{3}{4}$ Minute) zeigt, handelt es sich hier um eine verhältnismäßig resistente Zwiebel.

Tab. 4. *Allium cepa*, Innenepidermis. Schutzwirkung nach 30 Minuten Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff bzw. Thioazetamid auf die Plasmaströmung und auf die Form der Chondriosomen und Leukoplasten.

a Plasmaströmung: 1· beste Strömung, 1·(-) starke Strömung, 1· schwache Strömung, 1·(-) Glitschbewegung bis BMB; b Chondriosomen: lg lang, (lg) Kurzstäbchen, rd abgerundet; c Leukoplasten: am amöboid, (am) eingezogene Fortsätze, rd abgerundet.

Bestrahlungs- dauer (Min.)	Direkt auf H_2O bestrahlt (Kontrolle)	Bestrahlt nach 30 Minuten Vorbehandlung mit						Abgedeckt mit WG_5 (gleich für Thioharn- stoff u. Thioazetamid)		
		Thioharnstoff (0,1 mol)			Thioazetamid (0,1 mol)					
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
$\frac{1}{4}$		1·	lg	am	1·	lg	am	1·	lg	am
$\frac{1}{2}$	1·(-) rd rd	1·	lg	am	1·	lg	am	1·	lg	am
$\frac{3}{4}$	1·(-) rd rd	1·(-)	(lg)	(am)	1·	lg	am	1·	lg	am
1	1· rd rd	1·(-)	(lg)	(am)	1·	lg	am	1·	lg	am
$1\frac{1}{2}$	tot	1·	rd	rd	1·	lg	am	1·	lg	am
2	tot	1·(-)	rd	rd	1·	lg	am	1·	lg	am
$2\frac{1}{2}$	tot	1·(-)	rd	rd	1·(-)	lg	am	1·	lg	am
3	tot	tot			tot			1·	lg	am

Der bei gleicher Resistenzgrenze gegenüber der Thioharnstoff-Vorbehandlung weitgehende Schutz der Plasmaströmung und der Organellenformen durch Vorbehandlung mit Thioazetamid entspricht vollkommen den Verhältnissen bei Verwendung von Küvettenfiltern mit diesen Lösungen. Die starke UV-Absorption des Thioazetamids im Bereich zwischen 280 und 240 m μ wirkt sich demnach in gleicher Weise auch nach der Vorbehandlung aus. Man wird daher die Schutzwirkung des Thioazetamids auch hier in seiner physikalischen Absorption sehen müssen.

Die unverändert gute Plasmaströmung und normale Form von Chondriosomen und Leukoplasten in den vorbehandelten, aber bei der Bestrahlung durch WG_5 abgedeckten Schnitthälften zeigt gleichzeitig, daß die Vorbehandlung selbst weder auf Plasmaströmung noch auf Organellenform einen Einfluß gehabt hat.

Ein zweites Beispiel für die gleichartige Schutzwirkung von Abdeckung mit Küvettenfiltern und Vorbehandlung mit den entsprechenden Lösungen

geben die Plasmolyseformen 24 Stunden nach einer subletalen Bestrahlung von $\frac{1}{2}$ Minute Dauer. Abb. 14 stellt die Plasmolyseformen in den mit den verschiedenen Schutzstoffen vorbehandelten, einerseits durch das WG₅-Filter, andererseits direkt bestrahlten Schnitthälften einander gegen-

30' vorbehandelt mit:	abgedeckt (WG ₅)	bestrahlt
<i>Tetramethylthioharnstoff</i> (0,2 mol)		
<i>Thioharnstoff</i> (0,2 mol)		
<i>Methylthioharnstoff</i> (0,2 mol)		
<i>Thiocarbohydrazid</i> (0,1 mol)		
<i>Semicarbazid · HCl</i> (0,2 mol)		
<i>Thiosemicarbazid</i> (0,2 mol)		
<i>Mercaptoäthanol</i> (0,1 mol)		
<i>S-Methylthioharnstoff</i> (0,1 mol)		
<i>N-Azethylthioharnstoff</i> (0,1 mol)		
<i>Thioazetamid</i> (0,1 mol)		

Abb. 14. *Allium cepa*, Innenepidermis. Plasmolyseformen nach etwa 10 Minuten Liegen in 1,5 mol Glycerin (24 Stunden nach einer subletalen UV-Bestrahlung von $\frac{1}{2}$ Minute.

über. Die Darstellung ist zu vergleichen mit den in Abb. 11 wiedergegebenen Plasmolyseformen nach Bestrahlung durch entsprechende Küvettenfilter. Die Substanzen sind wieder in der Reihenfolge ihrer gegen den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums zunehmenden Transmission geordnet.

Wie in dem Küvettenfilterversuch der Abb. 11 zeigen sich auch nach Vorbehandlung mit Tetramethylthioharnstoff, dessen Transmission erst oberhalb des für den schnellen Plasmolyseeintritt und die rasche Rundung der Protoplasten maßgebenden Wellenbereiches beginnt, sowie auch nach Vorbehandlung mit N-Azetylthioharnstoff und Thioazetamid, die im Bereich zwischen $240\text{ m}\mu$ und $280\text{ m}\mu$ ein starkes Absorptionsmaximum besitzen, die gleichen normal konkav-zipfeligen Plasmolyseformen wie in den zur Kontrolle während der Bestrahlung mit WG_5 abgedeckten Schnitthälften.

Auch dies weist, zumindest für diesen Wellenbereich, mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen den Wirkungen der Küvettenfilter entsprechenden physikalischen Filtereffekt der Vorbehandlung hin.

b) Schutz gegen letale UV-Bestrahlung

Wie in der vorangegangenen Untersuchung (Biebl, Url, Janeček 1961, Tab. 23) gezeigt, entspricht bei Verwendung von Thioharnstoff die Wirkung einer halbstündigen Vorbehandlung mit einer $0,1\text{--}0,5\text{ mol}$ Lösung etwa dem Filterschutz einer $10\text{ }\mu$ dicken Schicht gleicher Konzentration im Küvettenversuch.

Die mikroskopische Betrachtung des Querschnittes einer vorbehandelten Zwiebel-Innenepidermiszelle zeigt nun, daß weder die etwa $4\text{ }\mu$ dicke Zellwand merklich aufquillt, noch daß das Protoplasma sein Volumen vergrößert. Es muß daher die der Flüssigkeitsschichtdicke von $10\text{ }\mu$ entsprechende Menge des Thioharnstoffes in der Zellwand oder vielleicht auch im Cytoplasma angereichert werden. Eine Speicherung im Zellsaft scheint, wie noch zu zeigen sein wird, auch für einen physikalischen Absorptionsschutz ohne wesentliche Bedeutung zu sein, da sich dieser nur auf die unterhalb der Zellsaftvakuole liegende Plasmaschicht auswirken kann.

In Abb. 15 sind für verschiedene UV-absorbierende Stoffe die Lebensgrenzen von Zwiebel-Innenepidermen 24 Stunden nach Bestrahlung a) durch ein Küvettenfilter, b) nach Vorbehandlung und c) für direkt auf Wasser bestrahlte Kontrollen einander gegenübergestellt. Die Konzentration der Filterflüssigkeit entsprach in diesen Versuchen stets einer $10\text{ }\mu$ dicken Schicht der zur Vorbehandlung verwendeten Konzentration.

Die in Abb. 15 durch horizontale Balken veranschaulichten Lebensgrenzen sind Ergebnisse bestimmter, individueller Versuche, wobei die zusammengehörigen Filter- und Vorbehandlungsversuche jeweils mit Epidermen ein und derselben Zwiebelschuppe durchgeführt wurden. Bei Wiederholung der Versuche mit anderen Zwiebeln können sich gewisse geringfügige Abweichungen ergeben. Die Substanzen in Abb. 15 sind geordnet nach ihrer Schutzwirkung im Küvettenfilter, d. h. nach der Stärke ihrer UV-Absorption.

Die Abb. 15 zeigt vor allem, daß das Ausmaß der Schutzwirkung einer Substanz im Küvettenfilter und nach Vorbehandlung nicht immer so weitgehend übereinstimmt wie beim Thioharnstoff. Am ähnlichsten liegen noch die Verhältnisse beim Methylthioharnstoff. Auch hier kommen sich Küvetten-schutz und Schutz durch Vorbehandlung ziemlich nahe. In allen anderen Fällen übertrifft der Küvetten-schutz jenen der Vorbehandlung beträchtlich.

Den extremsten Fall stellt in dieser Hinsicht der Tetramethylthioharnstoff dar. Dieser bietet im Küvettenversuch den größten Filterschutz von allen untersuchten Substanzen. Eine 1 cm dicke Schicht von $2 \cdot 10^{-4}$ mol in der Quarzküvette, die einer 10μ dicken Schicht von 0,2 mol entspricht, ver-

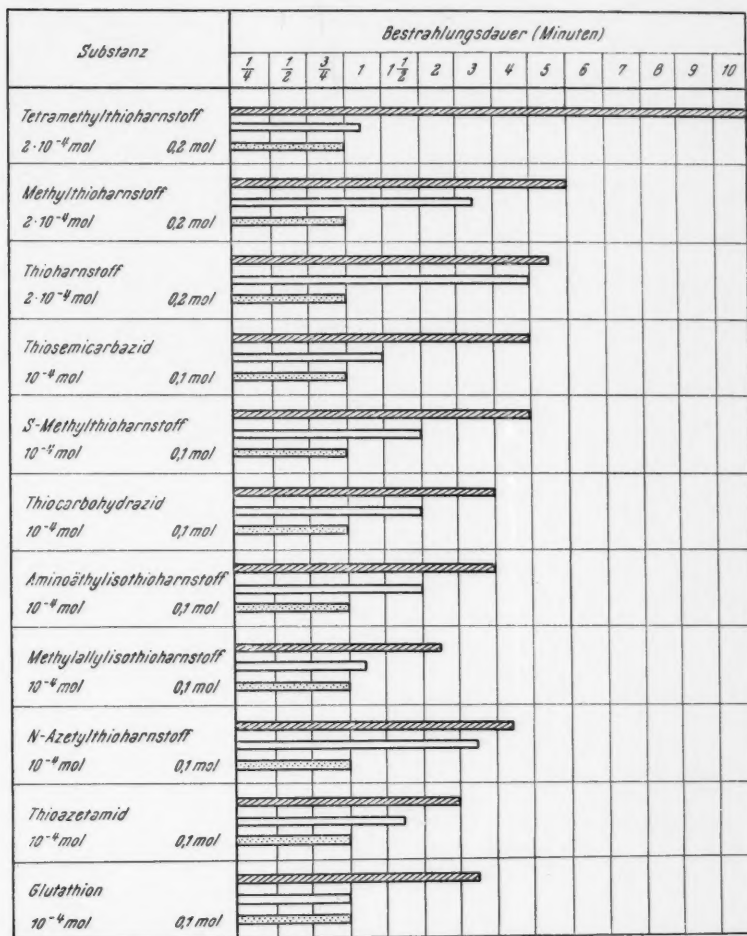


Abb. 15. *Allium cepa*, Innenepidermis. Vergleich des UV-Schutzes verschiedener Stoffe im Küvettenfilter und nach 30 Minuten langer Vorbehandlung. Lebenszustand 24 Stunden nach der Bestrahlung. (Die erste Konzentrationsangabe bezieht sich auf die 1 cm tiefe Küvette, die zweite auf die Vorbehandlung.)

Strichlierte Kästchen: lebend unter Küvettenfilter,

Leere Kästchen: lebend nach Vorbehandlung,

Punktierte Kästchen: lebend nach Bestrahlung auf H_2O (Kontrolle).

längert die letale Bestrahlungsdauer (1 Minute bei der direkt bestrahlten Kontrolle) auf etwa das Dreizehnfache. Eine Vorbehandlung mit 0,2 mol Tetramethylthioharnstoff vermochte jedoch die Innenepidermen der Zwiebel-schuppen in vielen Versuchen überhaupt nicht, in wenigen um einen eben wahrnehmbaren Betrag und nur in ganz vereinzelt Versuchen maximal bis zur doppelten letalen Bestrahlungsdauer der Kontrolle zu schützen.

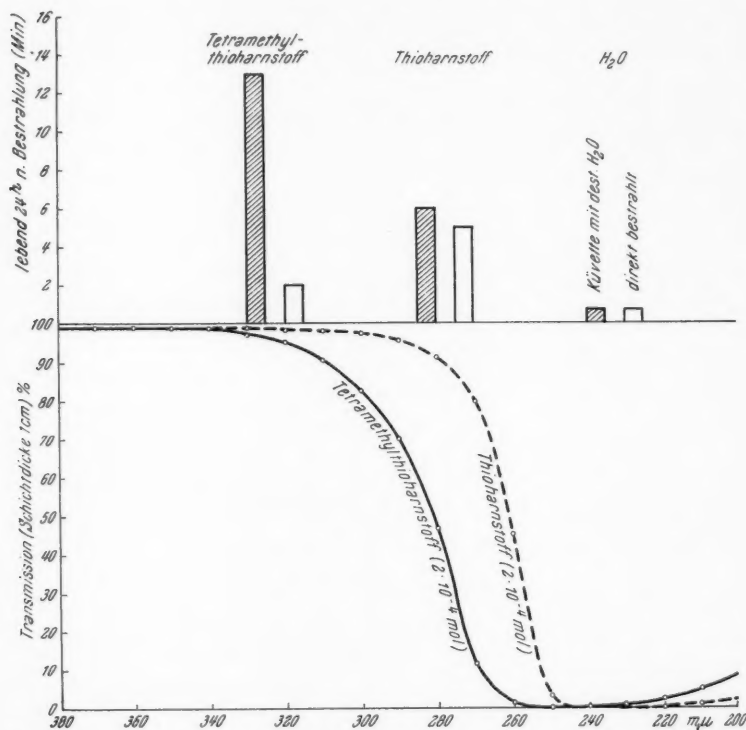


Abb. 16. *Allium cepa*, Innenepidermis. Schutz durch Küvettenfilter (strichlierte Kästchen) mit $2 \cdot 10^{-4}$ mol bzw. durch Vorbehandlung der Schnitte (leere Kästchen) mit 0,2 mol der Lösungen. ($2 \cdot 10^{-4}$ mol bei 1 cm = 0,2 mol bei 10 μ Schichtdicke.

Gleiche Konzentrationen von Thioharnstoff schützen als Küvettenfilter maximal nur bis zur 4- bis 6fachen letalen Bestrahlungsdauer der Kontrollen, erhöhten aber die Resistenz der vorbehandelten Schnitte fast bis zum gleichen Betrag.

Abb. 16 stellt aus einem anderen Versuch noch einmal dieses gegensätzliche Paar Tetramethylthioharnstoff und Thioharnstoff mit Angabe ihrer Transmissionskurven einander gegenüber. Die dunklen Säulen geben den Lebenszustand 24 Stunden nach Bestrahlung durch die Küvettenfilter, die

hellen Säulen jenen nach Vorbehandlung der Schnitte mit 0,2 molaren Lösungen der beiden Stoffe an. Zum Vergleich sind weiters auch die Lebensgrenzen nach direkter Bestrahlung auf wassergetränktem Filterpapier bzw. nach Bestrahlung durch die wassergefüllte Küvette eingezeichnet.

Beim Tetramethylthioharnstoff ist der Unterschied zwischen Schutz durch Küvettenfilter und durch Vorbehandlung sehr groß, beim Thioharnstoff sehr klein. Das Verhalten der übrigen untersuchten und in Abb. 15 zusammengestellten Substanzen liegt zwischen diesen beiden Extremen. Es wird in der „Besprechung der Versuche“ noch darauf zurückzukommen sein.

Die naheliegendste Erklärung, daß Tetramethylthioharnstoff von der Zelle nicht aufgenommen wird, trifft sicher nicht zu. Sein Permeationsvermögen durch das Protoplasma in die Vakuole ist infolge seiner großen Lipidlöslichkeit sogar größer als das von Harnstoff, Methylharnstoff, Dimethylharnstoff und Thioharnstoff. Tab. 5 bringt für die vier genannten Substanzen die von Collander und Bärland (1933) bestimmten Verteilungskoeffizienten in Gemischen von Äther und Wasser, von Öl und Wasser und von Olivenöl + Ölsäure und Wasser. Je höher der Wert, um so besser die Lipidlöslichkeit und damit das Permeiervermögen.

Tab. 5. Verteilungskoeffizienten von Harnstoff und einigen seiner Derivate (nach Collander und Bärland 1933).

	Verteilungskoeffizienten		
	Äther: H ₂ O	Olivenöl: H ₂ O	Öl + Ölsäure: H ₂ O
Harnstoff	0,00047	0,00015	0,0052
Methylharnstoff	0,0012	0,00044	0,0096
Dimethylharnstoff	0,0046	0,0023	0,029
Thioharnstoff	0,0063	0,0012	0,0040

Für Tetramethylthioharnstoff liegen keine Angaben über dessen Verteilungskoeffizienten vor, doch läßt sich aus Tab. 5 entnehmen, daß schon die Einführung einer Methylgruppe das Molekül wesentlich lipophiler macht. Der Tetramethylthioharnstoff mit seinen vier CH₃-Gruppen dürfte daher die lipophilste aller dieser Verbindungen sein. Dafür spricht auch seine geringe Wasserlöslichkeit, die zur Folge hat, daß schon bei ungefähr 0,17 mol die Sättigung erreicht ist.

Die Bestimmung seines Permeationsvermögens nach der üblichen plasmometrischen Methode durch Plasmolyse und Beobachtung der Rückgangsgeschwindigkeit (Höfler 1918) ist daher nicht möglich, da 0,17 mol noch hypotonisch ist. Es ließ sich aber auch keine Permeabilitätsbestimmung im Partialverfahren (vgl. S. 286) durchführen, da der Eintritt des Tetramethylthioharnstoffes so schnell vor sich geht, daß ein Gemisch einer plasmolyseerregenden Zuckerkonzentration plus 0,17 mol Tetramethylthioharnstoff gar keinen erfassbaren stärkeren Plasmolysegrad zustandekommen läßt.

Schließlich geht aber auch aus der mit dem Beckman-Spektralphotometers vorgenommenen vergleichenden Bestimmung der UV-Transmission von Zwiebel-Innenepidermen, die 30 Minuten mit Wasser (Kontrolle), mit

0,2 mol Thioharnstoff und mit 0,1 und 0,17 mol (in den Kurven immer als „0,2 mol“ bezeichnet) Tetramethylthioharnstoff (Abb. 17) hervor, daß beträchtliche Mengen von Tetramethylthioharnstoff in die Zellen eingedrungen sein müssen. Gleichzeitig zeigt dieser Versuch aber auch, daß der Eintritt eines stark UV-absorbierenden Stoffes in die Zellsaftvakuole noch keinen Schutz für die Zellen bedeutet. Voraussetzung für einen physikalischen

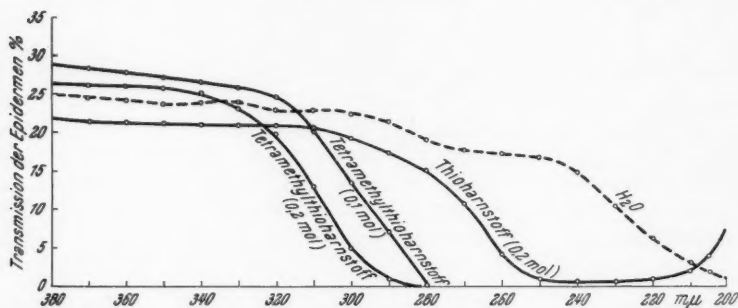


Abb. 17. *Allium cepa*. UV-Transmission durch wassergetränkte und 30 Minuten mit Thioharnstoff bzw. Tetramethylthioharnstoff vorbehandelte Zwiebel-Innenepidermen.

Absorptionsschutz scheint demnach die Anhäufung des absorbierenden Stoffes in der Zellwand oder im Cytoplasma selbst zu sein. Diese scheint aber beim Tetramethylthioharnstoff nicht gegeben zu sein.

Besprechung der Versuche

Die vorangegangene Untersuchung über die Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen kurzwelliges Ultraviolett (Biebl, Url, Janeček 1961) hat für Zwiebelepidermiszellen eine weitgehende Übereinstimmung der schützenden Wirkung des Thioharnstoffes im Küvettenfilter und nach Vorbehandlung der Schnitte mit ihm gezeigt. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß der UV-Schutz, der nach Vorbehandlung der Epidermen mit Thioharnstoff zu beobachten ist, wesentlich, wenn nicht ausschließlich, auf seine physikalische UV-Absorption zurückzuführen ist.

Vorliegende Arbeit, die der vergleichenden Untersuchung der Schutzwirkung verschiedenster schwefelhaltiger Verbindungen gewidmet war, wurde daher mit der Bestimmung der UV-Transmission aller für die Versuche ausersehenen Stoffe begonnen. Dabei konnte eine große Mannigfaltigkeit ihres Absorptionsverhaltens gegenüber kurzwelligem UV festgestellt werden. Viele Stoffe zeigen steil abfallende Transmissionsgrenzen, so daß sie als Filterflüssigkeiten in der Quarzküvette verwendet, eine Untersuchung der Wirkung verschiedener Bereiche der kurzwelligen UV-Strahlung ermöglichen. Mit dieser Frage beschäftigt sich der erste Teil der Arbeit.

Schon orientierende Versuche mit den Glasfiltern der Fa. Schott & Gen., WG₇, WG₇, UG₂ und UG₅ gaben eine gewisse Übersicht (Abb. 1). Für direkt

mit dem vollen Licht des Quarzbrenners bestrahlte Zwiebel-Innenepidermen (Kontrolle) beträgt die letale Bestrahlungszeit etwa 1 Minute. Unter WG_5 , WG_7 und UG_2 lebte auch nach 10 Minuten Bestrahlung noch alles, während unter dem UG_3 -Filter, das einen wesentlich größeren Anteil des kurzwelligen UV durchläßt, die Todesgrenze schon bei 4 Minuten Bestrahlung lag.

Je weiter die Lichtdurchlässigkeit der verwendeten Flüssigkeitsfilter gegen das kurzwellige Ende des UV-Spektrums hinausgeschoben war, um so geringer war deren Filterschutz. Während eine mit $2 \cdot 10^{-4}$ mol Tetramethylthioharnstoff in 1 cm dicker Schicht gefüllte Quarzküvette (Transmission $> 280 m\mu$) die letale Bestrahlungsdauer für eine darunterliegende Zwiebel-Innenepidermis auf das 15fache erhöhte, war sie unter $5 \cdot 10^{-4}$ mol Thioharnstoff ($> 260 m\mu$) nur mehr 9mal so lang, unter 2%iger Essigsäure ($> 240 m\mu$) 6mal so lang, unter 0,5%iger Essigsäure ($> 230 m\mu$) 4mal und unter 0,1 mol Semicarbazid ($> 220 m\mu$) doppelt so lang als für eine direkt bestrahlte Kontrolle.

Unabhängig von dieser gegen den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums zunehmend tödlich schädigenden Strahlenwirkung ist die Wirkung subletaler Bestrahlung mit mittleren Wellenlängen des UV auf die Permeabilitätseigenschaften des Protoplasmas, auf die Plasmaströmung und auf die Form der Chondriosomen und Leukoplasten.

Aus älteren Untersuchungen (Biebl 1942 a, b, Biebl und Uhl 1958) war bekannt, daß eine subletale Bestrahlung ($\frac{1}{2}$ Minute) mit dem vollen Licht einer Quecksilberdampflampe in Zwiebelepidermiszellen die Plasmaströmung verlangsamt, die Chondriosomen und Leukoplasten rundet, den Plasmolyseeintritt beschleunigt (Erhöhung der Wasserpermeabilität) und schneller zu einer Rundung der Protoplaste (Herabsetzung der Viskosität) führt. Alle diese Erscheinungen waren unter dem WG_5 - und dem UG_2 -Filter auch nach 10 Minuten und längerer Bestrahlung nicht zu beobachten, wurden aber bereits unter dem WG_7 -Filter durch eine 4 Minuten lange Bestrahlung ausgelöst (Tab. 1, Abb. 2). Es müssen also schon Wellenlängen zwischen den Transmissionsgrenzen des WG_5 und des WG_7 (etwa zwischen $310 m\mu$ und $260 m\mu$) maßgebend für diese Wirkungen auf das Protoplasma sein.

Bei Verwendung der Flüssigkeitsfilter (1 cm Schichtdicke) zeigte sich, daß unter etwa $2 \cdot 10^{-4}$ mol Tetramethylthioharnstoff (gesättigte Lösung), der nur Wellenlängen $> 280 m\mu$ durchläßt, ebensowenig wie unter dem WG_5 -Filter, ein Einfluß auf den Plasmolyseverlauf zu beobachten war. Unter $5 \cdot 10^{-4}$ mol Thioharnstoff, der durchlässig ist für UV-Licht von etwa $260 m\mu$ aufwärts, ruft hingegen eine innerhalb von 24 Stunden subletale Bestrahlung von $\frac{1}{2}$ Minute Dauer bereits den erwähnten schnelleren Plasmolyseeintritt und die schnellere Rundung der Protoplaste hervor (Abb. 11).

Das gleiche gilt für den Einfluß auf die Plasmaströmung und die Formveränderungen der Chondriosomen und Leukoplasten. Unter WG_5 wie auch unter $2 \cdot 10^{-4}$ mol Tetramethylthioharnstoff ist nach subletaler Bestrahlung keinerlei Veränderung zu beobachten. Die Zellen zeigen normal starke Plasmaströmung, die Chondriosomen sind zum Teil lang und flexibel, die Leukoplasten in ihrer Form amöboid. Schon unter $5 \cdot 10^{-4}$ mol Thioharnstoff

ist die Plasmaströmung aber äußerst verlangsamt und die Chondriosomen und Leukoplasten sind abgerundet (Tab. 2).

Filter, die nur durchlässig für kurzwelliges UV unter $260\text{ m}\mu$ sind, standen uns nicht zur Verfügung, doch fanden sich in 10^{-4} mol N-Azetylthioharnstoff und 10^{-4} mol Thioazetamid Filterflüssigkeiten, die in 1 cm dicker Schicht den Bereich zwischen rund $280\text{ m}\mu$ und $245\text{ m}\mu$ fast vollständig absorbieren (Abb. 7). Nach subletaler Bestrahlung ($\frac{1}{2}$ Minute) zeigten die unter diesen Filtern gelegenen Zwiebelepidermen die gleichen konkavzipfeligen Plasmolyseformen wie die mit WG_5 abgedeckten Kontrollen und auch die Plasmaströmung, sowie Form der Chondriosomen und Leukoplasten waren vollkommen normal.

Damit erscheint wohl erwiesen, daß für die nach subletaler, ungefilterter UV-Bestrahlung zu beobachtenden Veränderungen im Cytoplasma (Hemmung der Plasmaströmung, Permeabilitätsänderungen, Plasmolyseverlauf, Formänderungen der Chondriosomen und Leukoplasten) der Wellenbereich zwischen etwa $285\text{ m}\mu$ und $245\text{ m}\mu$ maßgebend ist. Damit stimmen auch die Beobachtungen von Glubrecht (1953) überein, der bei UV-Bestrahlung mit $280\text{ m}\mu$, $265\text{ m}\mu$ und $254\text{ m}\mu$ gleichfalls Wirkungen auf Plasmaströmung, Färbbarkeit mit Erythrosin u. a. feststellen konnte.

In diesen Wellenbereich fallen vor allem die starken Absorptionen der Nukleinsäuren mit einem Maximum bei $260\text{ m}\mu$ und der Proteine (z. B. Serumalbumin) mit einem Maximum bei $280\text{ m}\mu$, wobei die Absorptionsbande besonders den aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zukommen (Casperson 1958). Weiters absorbieren in diesem Teil des UV-Spektrums besonders stark Sterine, wie Ergosterin, bei etwa 270 bis $280\text{ m}\mu$, ferner Riboflavin bei etwa $265\text{ m}\mu$ (Sinsheimer 1955) oder Diphosphopyridinnukleotid von $280\text{ m}\mu$ abwärts, Nicotinamid bei $260\text{ m}\mu$, Formylpteroylglutaminsäure bei etwa $255\text{ m}\mu$ und viele andere biochemisch wichtige Stoffe (Otting 1956).

Welche dieser Stoffe durch ihre starke UV-Absorption maßgebend für die genannten Plasmaveränderungen sind, kann unseren Versuchen noch nicht entnommen werden. Auch einige eigene, orientierende Versuche mit monochromatischem Licht von 289, 265, 259 und $253,7\text{ m}\mu$ Wellenlänge gaben darüber keine Auskunft. Der Plasmolyseverlauf (d. h. Wasserpermeabilitäts-erhöhung, Viskositäts-erniedrigung), der in den mit diesen Wellenlängen bestrahlten Zwiebel-Innenepidermen beobachtet wurde, war in allen Fällen recht ähnlich. Doch überschneiden sich die Absorptionsmaxima der möglicherweise maßgebenden, oben erwähnten Plasmabaustoffen so sehr, daß eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Plasmaveränderungen zur Absorption eines bestimmten Stoffes auch kaum zu erwarten war. Wahrscheinlich sind es auch Strahlenwirkungen auf verschiedene der angeführten Substanzen, die für diese Veränderungen maßgebend sind.

Was die UV-Absorption in dem besonders schädlichen kürzestwelligen Bereich unter $230\text{ m}\mu$ anlangt, so zeigen hier fast alle Plasmabausteine, und zwar nicht nur die Proteine, sondern auch die Kohlehydrate (z. B. Glukose) starke Absorption. In diesem Bereich könnte es allerdings auch zu photochemischen Zersetzungen kommen, so daß auch die dabei entstehenden

lonen, Radikale und Peroxyde Anteil an der letalen Schädigung haben könnten.

Im zweiten Teil unserer Arbeit wurde der Schutz gegen die Wirkung kurzweiliger UV-Strahlen durch Vorbehandlung von Zwiebel-Innenepidermen mit den verschiedenen, in den Küvettenversuchen auf ihren Filterschutz geprüften Stoffen untersucht.

Schon die ersten Vorbehandlungsversuche mit 0,1 mol Thioharnstoff an Pflanzenzellen haben an Epidermen von Rotkohlblättern (*Brassica oleracea*), von Blättern von *Rhoeo discolor* und von Zwiebelschuppen von *Allium cepa* einen Schutz bis etwa zur doppelten, der zur Tötung unvorbehandelter Kontrollen nötigen UV-Bestrahlungsdauer ergeben (Biebl 1960). Durch Vorbehandlung mit konzentrierteren Lösungen (0,3—0,5 mol Thioharnstoff) wurde ein Schutz bis zur 6- bis 8fachen Letaldosis der Kontrollen erreicht (Biebl 1961).

Dieser hohe Schutz gegen die schädigende Wirkung kurzweiligen ultravioletten Lichtes übertrifft nun um ein Vielfaches jene Werte, wie sie aus der Literatur für chemischen Schutz gegen ionisierende Strahlen bekannt sind. Diese bewegen sich für die verschiedenen Strahlenschutzstoffe im allgemeinen zwischen 10 und 60% und erreichen nur in seltenen Fällen 100% der für unbehandelte Kontrollen letalen Strahlendosis. Hinsichtlich der zahlreichen Literatur sei hier auf die zusammenfassenden Darstellungen von Bacq und Alexander (1958), Hollaender et al. (1958) oder die seit 1954 in über 40 Mitteilungen zum biologischen Strahlenschutz in der „Strahlentherapie“ erschienenen Originalarbeiten von Langendorff und seiner Schule verwiesen.

Haben schon die vergleichend zur Vorbehandlung mit Thioharnstoff ausgeführten Küvettenfilterversuche mit dieser Substanz auf einen wesentlichen, wenn nicht ausschließlichen, Anteil der physikalischen UV-Absorption des Thioharnstoffes als Ursache seiner Schutzwirkung hingewiesen (Biebl, Url, Janeček 1961), so spricht die vorliegende, auf eine große Zahl weiterer als chemische Schutzstoffe in Betracht kommende Substanzen ausgedehnte Untersuchung gleichfalls für einen zumindest beherrschenden Anteil der physikalischen Absorption an der beobachteten Schutzwirkung.

Als schwerwiegendes Argument dafür kann gelten, daß Stoffe, die in der verwendeten Konzentration im Spektralphotometer keine oder nur eine ganz geringfügige UV-Absorption zeigen und daher im Küvettenversuch die darunter liegenden Zwiebelepidermen gegen die Wirkung des kurzweiligen UV nicht zu schützen vermögen, auch nach Vorbehandlung der Schnitte keinen Schutz gewähren (Abb. 13). Von den hierher zählenden Stoffen dringen Na-thioglykolat, Cystein-HCl, Na-dithionat, Na-Thiosulfat und Glutathion in der angewandten Vorbehandlungszeit allerdings wahrscheinlich nicht oder nur in Spuren in die lebende Pflanzenzelle ein. Aber auch Thio glyzerin und Mercaptoäthanol, die beide geradezu rapid durch das Plasma permeieren, lassen jede Schutzwirkung vermissen.

Dem gegenüber zeigten mit einer Ausnahme, von der noch zu sprechen sein wird, alle untersuchten, schwefelhaltigen Substanzen, die in den verwendeten Konzentrationen im Spektrophotometer eine starke UV-Absorption aufweisen und im Küvettenversuch den darunter liegenden Zwiebel-

epidermen Filterschutz gewähren, auch nach Vorbehandlung einen mehr oder weniger starken Schutz gegen die Wirkung der UV-Strahlen.

Auf einen gleichartigen Schutzmechanismus durch physikalische Absorption im Küvettenfilter-Versuch und nach Vorbehandlung der Zwiebelepidermen weisen im Bereich subletaler Bestrahlung besonders eindringlich die Versuche mit N-Azetylthioharnstoff und mit Thioazetamid hin. In beiden Fällen werden bei subletaler Bestrahlung die für Plasmolyseverlauf und Form der Chondriosomen und Leukoplasten wirksamen Wellenlängen zwischen $245\text{ m}\mu$ und $280\text{ m}\mu$ ausgeschaltet (Tab. 4, Abb. 14). In beiden Fällen fehlen die für die Bestrahlung mit diesem Wellenbereich charakteristischen Veränderungen.

Eine andere Parallele zwischen Schutzwirkung unter dem Küvettenfilter und durch Vorbehandlung wird bei Bestimmung der letalen Bestrahlungsdauer in den Versuchen mit Methylallylthioharnstoff (MAT) und mit Aminoäthylthioharnstoff Br.HBr (AET) deutlich. AET zeigt in einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Konzentration von 10^{-4} mol ($= 0,1\text{ mol}$ in $10\text{ }\mu$ dicker Schicht) von $220\text{ m}\mu$ zu $210\text{ m}\mu$ eine steile Transmissionsgrenze, während MAT in diesem Bereich noch eine größere Lichtdurchlässigkeit besitzt (Abb. 9). Dem entsprechend zeigt AET sowohl im Küvettenversuch wie auch nach Vorbehandlung der Zwiebel-Innenepidermen ein gegenüber MAT deutlich besseres Schutzvermögen (Abb. 15).

Auf gleicher Linie liegen die Unterschiede in der Schutzwirkung von Methylthioharnstoff und S-Methylthioharnstoff. In der verwendeten Konzentration wird Methylthioharnstoff erst von etwa $250\text{ m}\mu$ aufwärts lichtdurchlässig, während S-Methylthioharnstoff noch ein Transmissionsvermögen bis hinunter zu $230\text{ m}\mu$ besitzt (Abb. 8). Diesen verschiedenen Absorptionseigenschaften der beiden Lösungen entspricht wiederum sehr gut ihr Schutzvermögen. Sowohl als Filterflüssigkeit im Küvettenversuch wie nach Vorbehandlung der Schnitte schützt Methylthioharnstoff die UV-bestrahlten Zwiebelepidermen besser als S-Methylthioharnstoff (Abb. 15).

Und auch das schon oben erwähnte Paar N-Azetylthioharnstoff und Thioazetamid zeigt bei Bestimmung der letalen Bestrahlungsdauer deutliche Unterschiede, die ihrem Absorptionsverhalten gegenüber kurzwelligem UV entsprechen. Die Lichttransmission des N-Azetylthioharnstoffes schneidet in der im Versuch verwendeten Konzentration bei etwa $220\text{ m}\mu$ scharf ab. Die darunter liegenden Wellenlängen werden absorbiert. Thioazetamid besitzt hingegen auch zwischen $220\text{ m}\mu$ und $200\text{ m}\mu$ noch eine beträchtliche Lichtdurchlässigkeit (Abb. 7). Damit steht im Einklang, daß sowohl im Küvettenversuch wie nach Vorbehandlung der Schnitte (Abb. 15) N-Azetylthioharnstoff besser schützt als Thioazetamid.

Schließlich sei auch noch einmal auf den nach Vorbehandlung der Zwiebel-Innenepidermen mit Thioharnstoffkonzentrationen von $0,05$ bis $0,5\text{ mol}$ zu beobachtenden, gleichmäßigen Anstieg bis auf die 8fache Dauer der für unbehandelte Kontrollen letalen Bestrahlungszeit hingewiesen, der auch im Küvettenversuch eine entsprechende Zunahme der Filterschutzwirkung entspricht (Biebl, Url, Janeček 1961, Tab. 14, 15, Abb. 12).

Dem von uns beobachteten starken Schutz durch Vorbehandlung mit

verschiedenen schwefelhaltigen Verbindungen gegen die Wirkung kurzwelliger UV-Strahlen auf Pflanzenzellen entsprechen in ihren Beobachtungsergebnissen sehr gut die Untersuchungen von Erdmann (1956 a, b) an Euglobulinlösungen, von Erdmann, Meyer und Junghans (1957) an Eikernen der Flußmuschel und von Haltrich (1957) an Spermien von *Rana temporaria*. Es wird aber wohl auch dort die Deutung als „chemischer Strahlenschutz“ zugunsten eines physikalischen Schutzes durch UV-Absorption der verwendeten Schutzstoffe zu überprüfen sein. (Vergleiche hinsichtlich des UV-Absorptionsvermögens des Glutathions unsere Abb. 10, S. 276.)

Wenn z. B. *Unio*-Eikerne in einem Tropfen von Natriumthioglykolat bis zum 10fachen, in einigen Versuchen sogar bis zum 50fachen derjenigen Bestrahlungszeit geschützt werden, nach welcher die Kontrollen die ersten Schädigungen zeigen, so ist nach unseren Erfahrungen über das hohe UV-Absorptionsvermögen dieser schwefelhaltigen Substanzen doch recht wahrscheinlich, daß auch in den Versuchen von Erdmann und seinen Mitarbeitern der „konkurrierenden“ physikalischen Absorption zumindest ein überwiegender Anteil an der beobachteten Schutzwirkung zukommt.

Wenn aber Erdmann (1956 b) findet, daß Cystein, SH-Glutathion, Na-thioglykolat und α -Mono-Thioglyzerin das Eiglobulin nicht nur gegen ultraviolettes Licht, sondern auch gegen die Wirkung von Röntgenstrahlen schützen, so kann dies wohl als Beweis für einen chemischen Strahlenschutz gegen die Wirkung der Röntgenstrahlen angesehen werden, nicht aber auch als Beweis für einen chemischen Strahlenschutz gegen die Wirkung der UV-Strahlen, da diese Substanzen in den verwendeten Schichtdicken und Konzentrationen durch UV-Absorption zweifellos auch die Möglichkeit eines sehr hohen physikalischen Strahlenschutzes besitzen.

Wir haben das Vorherrschen eines physikalischen Absorptionsschutzes durch die in unseren Versuchen verwendeten Stoffe hergeleitet 1. aus ihrem, alle bisherigen Erfahrungen über chemischen Strahlenschutz um ein Vielfaches übertreffendes Schutzvermögen und 2. aus der großen Ähnlichkeit der Schutzwirkungen dieser Stoffe bei Anwendung im Küvettenfilterversuch und nach Vorbehandlung der Zwiebelepidermen mit ihnen. In beiden Fällen steht ihre Schutzwirkung in gutem Einklang mit ihren UV-Absorptionseigenschaften.

Offen bleibt allerdings noch die Frage, wie die Zelle in der Zellwand oder im Protoplasma die zur physikalischen UV-Absorption nötigen Stoffmengen speichert. Die Anreicherung in der Zellsaftvakuole scheint nämlich für die Schutzwirkung von geringerer Bedeutung zu sein. Dies wohl deshalb, weil durch sie nur die unterhalb der Vakuole gelegenen Plasmaschichten einen Filterschutz erfahren, die Schädigung der über ihr liegenden Plasmamassen aber nicht verhindert werden kann.

Von den Untersuchungen mit Thioharnstoff ausgehend, wo sich eine weitgehende Übereinstimmung der Wirkung nach Vorbehandlung mit 0,1, 0,2 und 0,5 mol Thioharnstoff und dem Schutzeffekt von Küvettenfiltern ergeben hatte, in denen der Thioharnstoff in Konzentrationen enthalten war, die einer 10 μ dicken Schichte von 0,1, 0,2 und 0,3 mol entsprechen (Biebl, Url, Janeček 1961, Tab. 23), haben wir als Arbeitshypothese angenom-

men, daß die zur Vorbehandlung verwendeten Stoffe in der Pflanzenzelle etwa in Mengen zur Wirkung kommen, die in ihrem Filterschutz einer $10\ \mu$ dicken Flüssigkeitsschichte gleicher Konzentration entsprechen.

Schon die Beobachtungen an mit Thioharnstoff vorbehandelten Zwiebel-epidermen haben aber gezeigt, daß es sich dabei nicht um eine $10\ \mu$ dicke Flüssigkeitsschichte selbst handeln kann. Für eine solche wäre in der Zellwand und im Protoplasma gar kein Platz bzw. ihr Vorhandensein müßte sich in einer entsprechend starken Zellwand- oder Plasmaquellung zu erkennen geben, was aber nicht der Fall ist. Man wird daher annehmen müssen, daß der Thioharnstoff in der Zellwand oder im Protoplasma angereichert wird. Welcher Mechanismus dieser Anreicherung zugrunde liegt, ist noch eine offene Frage. Obwohl die Dissoziationskonstante des Thioharnstoffes äußerst klein und die Halbwertsstufe erst bei pH 0,96 erreicht ist, scheint bei neutraler Reaktion doch eine gewisse elektroadsorptive Bindung an saure Membransubstanzen möglich zu sein, da es in einigen Versuchen gelungen ist, durch Zusatz von CaCl_2 die Schutzwirkung des Thioharnstoffes herabzusetzen. Das würde sich aus einer Verdrängung der Thioharnstoffionen durch die doppelt geladenen Ca-Ionen aus ihren elektroadsorptiven Bindungen erklären (siehe Biebl, Url, Janeček 1961, Tab. 24).

Thioharnstoff steht seinem Verhalten nach an dem einen Ende der Reihe der von uns untersuchten Substanzen. Seine Schutzwirkung im Küvettenfilterversuch und nach Vorbehandlung ist für Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 mol (im Küvettenversuch bezogen auf $10\ \mu$ Schichtdicke) nahezu gleich. Von Thioharnstoff wissen wir, daß sein Permeationsvermögen bis in die Zellsaftvakuole gering ist, daß er aber schon nach kurzer Vorbehandlung des Schnittes (5 Minuten) wirksam wird und daß ein kurzes Auswaschen (5 Minuten) der vorbehandelten Schnitte auch noch die Wirkung einer 15 Minuten langen Vorbehandlung vollkommen aufhebt. Er muß also äußerst rasch in einer für seine Schutzwirkung hinreichenden Menge in die Zellwand oder in das Protoplasma eindringen und sich dort ohne festere Bindung anreichern.

Die übrigen untersuchten Stoffe, die in den Küvettenversuchen einen deutlichen Filterschutz gewähren, schützen im Vorbehandlungsversuch fast durchwegs wesentlich weniger. Vermutlich ist die Ursache dafür in einer geringeren Anreicherung oder einem geringeren Eindringen des schützenden Stoffes in die Zelle gelegen.

Tetramethylthioharnstoff steht in seinem Verhalten in extremem Gegensatz zum Thioharnstoff und unterscheidet sich damit auch von den übrigen untersuchten Stoffen. Infolge seiner starken UV-Absorption bietet er als Küvettenflüssigkeit den besten Filterschutz. Er vermag auch sehr rasch in die Zellsaftvakuole zu permeieren, muß daher auch rasch in die Zellwand und in das Cytoplasma eindringen. Trotzdem übt er in den mit ihm vorbehandelten Epidermiszellen so gut wie überhaupt keinen Schutz aus. Dies beweist gleichzeitig, daß eine bloße Imbibition der Zellwand, die ja zweifellos gegeben ist, noch nicht ausreicht, um eine wirksame Absorption des kurzwelligen UV zu gewährleisten. Die fehlende Schutzwirkung nach Vorbehandlung mit Tetramethylthioharnstoff ist schließlich auch eine Kon-

trolle dafür, daß bei der Bestrahlung der Schnitte nach erfolgtem Absaugen ihrer Oberseite mit einem Filterpapier keine überstehende Flüssigkeitsschicht eine schützende Filterwirkung ausübt, denn diese müßte bei der starken UV-Absorption des Tetramethylthioharnstoffes besonders deutlich in Erscheinung treten.

Zu beachten ist allerdings, daß in den mit Tetramethylthioharnstoff vorbehandelten Schnitten die UV-Absorption im längerwelligen Bereich, d. i. etwa zwischen $250\text{ m}\mu$ und $280\text{ m}\mu$ anscheinend doch stark genug ist, um die für diesen Bereich charakteristische Beeinflussung der sich im Plasmolyseverlauf ausdrückenden Änderungen der Wasserpermeabilität und der Viskosität sowie der Plasmaströmung und Organellenformen zu verhindern (Tab. 4, Abb. 14).

Nach den in der Literatur vorliegenden Erfahrungen erscheint eine chemische Strahlenschutzwirkung vor allem an das Vorhandensein von —SH- und $\text{—NH}_2\text{-}$ Gruppen gebunden, die mit den strahlendchemisch entstehenden Zerfallsprodukten in Reaktion treten und diese dadurch unschädlich machen (Langendorff, Koch und Hagen 1954 a, b. Bacq und Alexander 1958 u. a.). Beide fehlen dem Tetramethylthioharnstoff. Er ist auch nicht befähigt, eine SH-Gruppe zu bilden, wie dies der Thioharnstoff in seiner tautomeren Form kann. Trotzdem möchten wir aber aus diesem beim Tetramethylthioharnstoff gegebenen Zusammentreffen einer starken Filterschutzwirkung im Küvettenversuch, der Unfähigkeit Zwiebel-epidermen durch Vorbehandlung zu schützen und dem Fehlen von SH- und $\text{NH}_2\text{-}$ Gruppen nicht darauf schließen, daß daher in allen anderen Fällen, in denen nach Vorbehandlung Schutzwirkungen beobachtet werden konnten, ein chemischer Strahlenschutz vorliegt.

Es scheinen uns doch die vorhin angeführten Indizien, wie Schutz bis zur 8fachen Letaldosis unbehandelter Kontrollen, Übereinstimmung der relativen Schutzwirkung (sowohl im Küvettenversuch wie nach Vorbehandlung) mit dem UV-Absorptionsvermögen der verwendeten Stoffe und die Ähnlichkeit der nach subletaler Bestrahlung durch die Küvettenfilter, wie der vorbehandelten Schnitte zytomorphologisch erfassbaren Schutzwirkungen nachdrücklich für ein Vorherrschen eines Schutzmechanismus durch physikalische Absorption zu sprechen.

Es sei aber abschließend betont, daß sowohl das eigenartige Verhalten des Tetramethylthioharnstoffes wie auch die starke Thioharnstoffanreicherung in der Zellwand oder im Cytoplasma der vorbehandelten Zelle, die wir bei Annahme eines vorwiegend oder ausschließlichen physikalischen Absorptionsschutzes voraussetzen müssen, noch weiterer Untersuchung bedürfen. Eine klare Einsicht in die dabei vorliegenden Gegebenheiten würde das Verständnis des Schutzes der Pflanzenzelle durch chemische Stoffe gegen die Einwirkung kurzweiliger UV-Strahlen weitgehend untermauern und sichern. Alle Abweichungen von diesen beiden Extremtypen dürften sich dann verhältnismäßig leicht aus den chemischen Eigenschaften der verwendeten Schutzstoffe wie aus der von Objekt zu Objekt verschiedenen Zellwandbeschaffenheit und der Permeabilität, dem Speichervermögen oder der verschiedenen Resistenz des Protoplasmas erklären lassen.

Zusammenfassung

1. Vorliegende Arbeit setzt die mit Thioharnstoff begonnene Untersuchung über die Möglichkeit des Schutzes von Pflanzenzellen gegen die Wirkung kurzwelliger UV-Strahlen (Biebl, Url, Janeček 1961) mit einer größeren Reihe schwefelhaltiger Verbindungen fort.

2. Schon bei den Thioharnstoff-Versuchen hat sich eine große Ähnlichkeit der Schutzwirkung ergeben, wenn die Versuchsobjekte (Epidermen von *Brassica oleracea*, *Rhoeo discolor*, Zwiebelschuppen von *Allium cepa*) durch eine mit Thioharnstoff gefüllte Quarzküvette bzw. nach Vorbehandlung mit Thioharnstoff mit UV ($< 310 \text{ m}\mu$) bestrahlt wurden. Es wurde daher auch die Schutzwirkung nach Vorbehandlung wesentlich (wenn nicht ausschließlich) auf physikalische Absorption des kurzwelligen UV in dem von der Zelle aufgenommenen Thioharnstoff zurückgeführt.

3. Hauptversuchsobjekt waren auch in vorliegender Untersuchung die Innenepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa*. Als Strahlenquelle diente wieder eine Quarzanalysenlampe mit einem geraden Hochdruckbrenner (AS 300) der Fa. Astralux (Wien) bei normaler Netzspannung von 220 V. Bestrahlt wurde stets aus 23 cm Entfernung.

4. Alle zur Prüfung auf ihre Schutzwirkung ausersehenen Substanzen wurden mit einem Beckman-Spektralphotometer in den in Frage kommenden Konzentrationen auf ihr Transmissionsverhalten gegen ultraviolettes Licht untersucht. Ihr Transmissionsvermögen für kurzwelliges UV erwies sich als sehr unterschiedlich.

5. In Quarzküvetten gefüllt ergaben sie eine Reihe von Filtern, deren Transmissionsvermögen mit scharfen Grenzen abgestuft von etwa $280 \text{ m}\mu$ bis hinunter zu $210 \text{ m}\mu$ in den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums fortschritt.

6. Diese Stufenfilter erlaubten die Durchführung von UV-Bestrahlungen mit immer größeren Anteilen an kurzwelligen Strahlen. Die Bestimmung der letalen Bestrahlungszeiten ergab eine gleichmäßig gegen den kurzwelligen Bereich zunehmende Schadwirkung des ultravioletten Lichtes.

7. Die besondere Schädlichkeit der kurzwelligen UV-Strahlen geht hervor aus der verhältnismäßig starken Schutzwirkung, die noch durch Küvettenfilter erreicht wird, deren Durchlässigkeit bis weit gegen das kurzwellige Ende des UV-Spektrums reicht. So schützt ein 0,5%iges Essigsäure-Küvettenfilter, das von etwa $230 \text{ m}\mu$ aufwärts für ultraviolettes Licht durchlässig ist, die darunter liegende Zwiebelschuppen-Innenepidermis bis zum 4fachen der für die direkt bestrahlten Kontrollen letalen Bestrahlungszeit und ein 0,1 mol Semicarbazid-Filter, das bis unterhalb $220 \text{ m}\mu$ durchlässig ist, verlängert die letale Bestrahlungszeit der Kontrolle immer noch auf das Doppelte (Abb. 6).

8. Diese Schädlichkeit des kurzwelligen UV wird eindrucksvoll bestätigt durch Filterflüssigkeiten, deren Transmissionskurven zwar schon im Bereich mittlerer Wellenlängen abschneiden, die aber im kurzwelligen Spektralbereich (etwa um $230 \text{ m}\mu$) ein zweites Transmissionsmaximum besitzen. Dieses reicht aus, um bei Bestrahlung durch ein solches Filter die

darunter liegenden Zellen stärker schädigen als dies durch Filter geschicht, die wie 0,5%ige Essigsäure mit scharfer Grenze bei etwa $230\text{ m}\mu$ ihre Durchlässigkeitsgrenze nach unten erreichen (Abb. 7).

9. Versuche mit den Schott-Filtern WG_5 und WG_7 wiesen darauf hin, daß verschiedene Plasmazustände, die sich in Plasmaströmung, Plasmolyseverlauf (d. h. Wasserpermeabilität und Viskosität) oder Form der Chondriosomen und Leukoplasten ausdrücken, schon durch Wellenlängen oberhalb der Durchlässigkeitsgrenze des WG_7 (etwa $>270\text{ m}\mu$) beeinflusst werden, während Wellenlängen, die erst das WG_5 -Filter durchdringen ($>310\text{ m}\mu$), ohne jede Wirkung bleiben.

10. Subletale Bestrahlungen durch verschieden UV-durchlässige Küvettenfilter bestätigten die Wirkung dieses UV-Bereiches auf Protoplasma, Chondriosomen und Leukoplasten (Abb. 11, Tab. 2). Besonders aufschlußreich war in dieser Hinsicht die Verwendung von N-Azetylthioharnstoff und Thioazetamid als Filterflüssigkeiten. Obwohl beide Substanzen in den verwendeten Konzentrationen im kurzwelligen Bereich um $230\text{ m}\mu$ ein hohes Durchlässigkeitsvermögen besitzen und daher gegen letale Bestrahlungen nur wenig schützen, verhindern sie bei Anwendung subletaler Bestrahlungszeiten infolge ihrer hohen Absorption zwischen etwa $250\text{ m}\mu$ und $280\text{ m}\mu$ die typischen UV-Wirkungen auf Plasmolyseverlauf und Organellenform (Abb. 11, Tab. 2).

11. Die vorbehandelten Zwiebelepidermen lagen während der Bestrahlung auf einem mit derselben Lösung getränktem Filterpapier und wurden vor Bestrahlungsbeginn oberseits mit einem Filterpapier trockengesaugt. Es war daher nie eine überstehende Flüssigkeitsschicht, die den Filterschutz gewährte, sondern stets nur die Menge des betreffenden Stoffes, die sich in der Zellwand oder im Cytoplasma während der Vorbehandlung angereichert hatte.

12. Ein Vergleich der Schutzwirkung der verschiedenen Stoffe im Küvettenversuch und nach Vorbehandlung der Zwiebelepidermen zeigte, daß ein deutlicher Schutz durch Vorbehandlung nur mit jenen Substanzen zu erzielen war, die auch in der Quarzküvette entsprechenden Filterschutz gewährten.

13. Das Ausmaß der Schutzwirkung nach Vorbehandlung stimmt bei den meisten Substanzen sehr gut mit ihrer UV-Absorption und dem Ausmaß ihres Schutzes im Küvettenfilter überein. Mit $0,5\text{ mol}$ Thioharnstoff kann nach Vorbehandlung ein Schutz bis zur 8fachen Letaldosis der unbehandelten Kontrolle erreicht werden.

14. Die für „chemischen Strahlenschutz“ ungewöhnlich hohe Schutzwirkung einzelner Substanzen, die Übereinstimmung der relativen Schutzwirkung (im Küvettenversuch und nach Vorbehandlung) mit der UV-Absorption der verwendeten Stoffe und die bei Anwendung subletaler Bestrahlungszeiten im Küvettenversuch und nach Vorbehandlung ähnliche Schutzwirkung gegen Veränderungen im Protoplasma führen zu dem Schluß, daß auch bei den vorbehandelten Zellen die beobachtete Schutzwirkung wesentlich auf physikalische Absorption zurückzuführen ist.

15. Das verschiedene Ausmaß des durch Vorbehandlung erzielten Schutzes

gegen kurzwelliges UV scheint außer von den Absorptionseigenschaften des betreffenden Stoffes besonders von dem Grad der Anreicherung dieses Stoffes in der Zellwand bzw. im Protoplasma abhängig zu sein. Die Anreicherung in der Zellsaftvakuole dürfte hingegen geringere Bedeutung haben.

16. Extreme Gegensätze in ihrer Schutzwirkung nach Vorbehandlung sind Tetramethylthioharnstoff und Thioharnstoff. Beide zeigen in der Küvette infolge ihrer starken UV-Absorption einen kräftigen Schutz. Tetramethylthioharnstoff dringt auch leicht durch das Protoplasma bis in den Zellsaft ein. Trotzdem zeigt Tetramethylthioharnstoff nach Vorbehandlung keinen oder nur einen minimalen Schutz, während Thioharnstoff nach Vorbehandlung fast bis zur Höhe der Küvettenwerte zu schützen vermag. Die übrigen Substanzen fallen in ihrem Verhalten zwischen diese beiden Extreme.

17. Tetramethylthioharnstoff hätte allerdings infolge seiner chemischen Konstitution auch keine Befähigung zu chemischem Strahlenschutz. Wollte man aber ihn, der im Küvettenfilter durch seine UV-Absorption am besten und nach Vorbehandlung der Schnitte am schlechtesten schützt, als einen Beweis für die chemische Schutzwirkung aller anderen durch Vorbehandlung gegen die Wirkung kurzwelliger UV-Strahlen schützenden Stoffe ansehen, so müßte man sich mit einem 8fachen chemischen Strahlenschutz durch Vorbehandlung mit 0,5 mol Thioharnstoff abfinden.

Es erscheint uns daher richtiger, die Ursache des verschiedenen starken UV-Schutzes der Zwiebelepidermen durch Vorbehandlung mit UV-absorbierende Substanzen im allgemeinen auf ein verschiedenes Anreicherungsvermögen dieser Stoffe in Zellwand oder Protoplasma und damit eine verschieden starke physikalische UV-Absorption zurückzuführen und das Verhalten des Tetramethylthioharnstoffes einstweilen als einen einer weiteren Erklärung bedürftigen Sonderfall abzutrennen.

18. Der Anreicherungsmechanismus für die verschiedenen Stoffe in Zellwand oder Protoplasma wäre als Gegenstand einer eigenen physikochemischen Studie weiter zu verfolgen.

Literatur

- Alexandrow, W. J., und M. N. Grousowa, 1960: Über die mikroskopische Struktur der Kerne von Epidermiszellen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* L. *Cytologia* 2, 389—395.
- Bacq, Z. M., und P. Alexander, 1958: Grundlagen der Strahlenbiologie. G. Thieme, Stuttgart. 396 S.
- Biebl, R., 1942 a: Wirkung der UV-Strahlen auf *Allium*-Zellen. *Protoplasma* 36, 491—513.
- 1942 b: Wirkung der UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. *Protoplasma* 37, 1—24.
- 1960: Die Pflanzenzelle als Objekt zur Prüfung chemischer Strahlenschutzstoffe. *Anz. Österr. Akad. Wiss.*, Nr. 2, 1—10.
- 1961: Protection against the effect of short-wave UV-rays on plant cells. The Finsen Memorial Congress. *Proceed. 3rd Intern. Congress on Photobiology* (im Druck).

- Biebl, R., und W. Url, 1958: UV-Strahlenwirkungen auf Zellen von *Allium cepa*, besonders deren Chondriosomen und Plastiden. *Protoplasma* 49, 329—352.
- , W. Url und G. Janeček, 1961: Untersuchungen über Strahlenschutz an Pflanzenzellen. I. Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen kurzwellige UV-Strahlen. *Protoplasma* 53, 320—376.
- Bonte, H., 1935: Vergleichende Permeabilitätsstudien an Pflanzenzellen. *Protoplasma* 22, 209—242.
- Caspersson, T., 1958: Der Eiweißwandel im Zellkern. In: Ruhland, Handb. d. Pflanzenphysiol. 8, 464—476.
- Collander, R., und H. Bärlund, 1933: Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla* II. *Acta Bot. Fenn.* 11.
- Erdmann, K., 1956 a: Versuche zur Aufhebung der koagulierenden Wirkungen von ultravioletem Licht und von Röntgenstrahlen auf Englobulin mit Strahlenschutzstoffen. *Protoplasma* 45, 293—314.
- 1956 b: Zusammenhänge zwischen reduzierenden Eigenschaften und Schutzwirkung von SH-Verbindungen gegen Strahlen (Versuche an Englobulinlösungen). *Protoplasma* 47, 384—397.
- , I. Meyer und S. Junghans, 1957: Versuche zur Verhinderung von Ultraviolett-Wirkungen auf den Inhalt überlebender tierischer Zellkerne mit Strahlenschutzstoffen. *Protoplasma* 48, 198—214.
- Fitting, H., 1929: Über die Auslösung von Plasmaströmung durch optisch-aktive Aminosäuren. *Jb. wiss. Bot.* 70, 1—25.
- 1950: Untersuchungen über die Natur der chemodinetischen Reizung und über die Unterschiedsschwellen für l-Asparagin. *Z. Bot.* 23, 528—560.
- Fluke, D. J., und R. B. Setlow, 1954: Water-Prism Ultraviolet Monochromators. *Journ. Optical Soc. America* 44, 327—350.
- Glubrecht, H., 1953: Über die Wirkung von UV-Strahlen in somatischen Zellen. *Z. Naturforsch.* 8 b, 17—27.
- Haltrich, W., 1957: Beeinflussung der teilungshemmenden Wirkung von ultravioletem Licht durch Strahlenschutzstoffe. *Naturwiss.* 44 (N. 18), 497.
- Höfler, K., 1918: Permeabilitätsbestimmung nach der plasmometrischen Methode. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 36, 414—422.
- 1931: Das Permeabilitätsproblem und seine anatomischen Grundlagen. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 49, (79)—(95).
- 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. *Protoplasma* 40, 426—460.
- Hofmeister, L., 1948: Über die Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit. *S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I*, 157, 55—82.
- Hollaender, A., C. C. Congdon, D. G. Doherty, T. Makinoda and A. C. Upton, 1959: New Development in Radiation Protection and Recovery. *Proc. Int. Conf. Peaceful Uses of Atom Energy*, Geneva 1958, 23, 3—9.
- Langendorff, H., R. Koch und U. Hagen, 1954 a: Zum Wirkungsmechanismus des Thioharnstoffes beim biologischen Strahlenschutz. *Arch. int. Pharmakodyn.* 100, 1—16.
- —, 1954 b: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. VIII. Mitteilung: Zur Spezifität des Cystein und verwandter Sulfhydrylkörper beim Strahlenschutz. *Strahlentherapie* 95, 238—250.
- Livingstone, R., 1955: Photochemistry. In: A. Hollaender, *Radiation Biology 2: Ultraviolet and Related Radiations*, 1—40.
- Otting, W., 1956: Absorptionsspektren. In: Rauen, *Biochemisches Taschenbuch*, 490—536.

- Sinsheimer, R. L., 1955: Ultraviolet Absorption Spectra. In: A. Hollaender, Radiation Biology 2, 165—201.
- Strugger, S., 1935: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie. Berlin.
- Toth, A., 1949: Quantitative Untersuchungen über die Wirkung der UV-Bestrahlung auf die Plasmapermeabilität. Österr. bot. Z. 96, 161—195.
- Url, W., 1959: Vergleichende Untersuchungen über die Resistenz pflanzlicher Plasmen gegen Natriumkarbonat. Protoplasma 51, 338—370.
- Werth, W., 1961: Vergleichende Untersuchungen über die relative Permeabilität des Protoplasmas für Alkohol und Wasser. Protoplasma 53, 457—503.
- Zehetner, H., 1954: Untersuchungen über die Alkoholpermeabilität des Protoplasmas. Jb. wiss. Bot. 80, 505—566.

Kurze Mitteilungen

Cytologische Studien IX

Die elektronenmikroskopische Feinstruktur des Grundcytoplasmas nach „wasserlöslicher Einbettung“

Von

K. E. Wohlfarth-Bottermann

Aus dem Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie am Zoologischen Institut der Universität Bonn

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 16. März 1961)

In verschiedenen Arbeiten in dieser Zeitschrift (Schneider u. Wohlfarth-Bottermann 1959, Wohlfarth-Bottermann 1960, 1961) ist versucht worden, die Feinstruktur der Grundsubstanz des Cytoplasmas durch elektronenmikroskopische Untersuchungen u. a. am Hyaloplasma von Amöben zu analysieren, weil hier und besonders bei einer bestimmten Art der Limax-Gruppe (*Hyalodiscus simplex*) die cytoplasmatische Grundsubstanz in einem definierten Zellbereich in reiner Form regelmäßig zu finden ist. Die Ergebnisse konnten bisher durch vergleichende Auswertung der Wirkung verschiedener Fixationsmittel gesichert, jedoch mußten alle Untersuchungen nach einer Entwässerung und Einbettung der Zellen in Methacrylate bzw. Polyester vorgenommen werden. Es erschien daher dringend wünschenswert zu prüfen, ob die in den vorangehenden Untersuchungen gewonnenen Ansichten über eine elektronenmikroskopisch analysierbare Feinstruktur der Grundsubstanz des Cytoplasmas von Amöben auch nach Verwendung eines wasserlöslichen Einbettungsmittels, d. h. unter Vermeidung der Alkohol- bzw. Aceton-Entwässerung im Präparationsgang, bestätigt werden konnten.

Nachdem Stäubli (1960) ein brauchbares wasserlösliches Einbettungsmittel in die Elektronenmikroskopie eingeführt hat (*CIBA-Versuchsprodukt X 133/2097*) konnten Leduc und Mitarb. (1960 a u. b) zeigen, daß bei Leber- und Pankreas-Zellen nicht nur eine prinzipielle Übereinstimmung der Feinstrukturen mit und ohne Entwässerung der Objekte durch Alkohol bzw. Aceton besteht, sondern daß sogar gewisse Zellstrukturen (Ergastoplasma und Kerne) nach geeigneter Fixation noch im fertigen Dünnschnitt durch verschiedene Enzyme spezifisch andaubar sind, wenn das wasserlösliche Einbettungsmittel Verwendung findet und die Fixation

der Zellen in geeigneter Form (relativ kurze Formalin-Einwirkung) vorgenommen wird. Dieser Befund bedeutet, daß zumindest gewisse elektronenmikroskopisch sichtbare Feinstrukturen des Cytoplasmas durch die notwendigen präparativen Eingriffe chemisch kaum verändert werden, was ein wesentliches Argument bei der Entscheidung der Frage nach ihrer Natur-treue im elektronenmikroskopischen Bild ist.

Nach Osmium-Chrom-Fixierung und Einbettung der Zellen in das genannte wasserlösliche Produkt (*X 133/209?*)¹⁾ konnten wir bei *Hyalodiscus simplex* (Abb. 1) sowohl für das Ektoplasma (Hyaloplasma, d. h. die reine Grundsubstanz des Cytoplasmas) als auch für das Endoplasma (Grundsubstanz + Membrankomponenten, eingelagert Mitochondrien + Kern) eine sehr weitgehende Übereinstimmung der Feinstrukturen mit den bisherigen Ergebnissen (Wohlfarth-Bottermann 1959, 1960, 1961) nach Methacrylat- und Vestopal-Einbettung finden. Zwar liefert das wasserlösliche Einbettungsmittel leider weitaus weniger brillante Bilder als eine Vestopal-Einbettung, die prinzipielle Übereinstimmung aller wesentlichen Zellstrukturen ist jedoch nicht zu verkennen.

Man ersieht im einzelnen aus Abb. 1 a, die einen Ausschnitt aus dem hyaloplasmatischen Lappen von *Hyalodiscus* und einen Teil des charakteristischen Plasmalemmas darstellt, daß die Feinstruktur der Grundsubstanz sehr fein granulär bzw. fädig ist. Wie schon erwähnt, ist der Kontrastreichtum der Abbildungen geringer als nach Vestopal-Einbettung, so daß die (ohne hin zumeist nicht leichte) Darstellung der Feinstruktur der cytoplasmatischen Grundsubstanz schwierig ist. Eine prinzipielle Übereinstimmung auch des Aufbaues des komplizierten Plasmalemmas der Amöben (Wohlfarth-Bottermann, 1960) mit seinen den Membranen anliegenden Härchen ist aber gegeben.

Abb. 1 b stellt einen typischen Ausschnitt aus dem Endoplasma dar. Die charakteristischen Feinstrukturen der Mitochondrien (M), die *Tubuli mitochondriales* sind andeutungsweise zu erkennen. Sehr viel klarer treten die für das Endoplasma eigentümlichen Membranstrukturen hervor, die in Abb. 1 b durch Pfeile markiert sind. Am rechten oberen Bildrand sind einige Pinocytose-Bläschen zu erkennen. Auf eine eingehende Beschreibung der Einzelstrukturen und ihre Deutung kann verzichtet werden, da diese in den vorangegangenen Arbeiten erfolgt und dort durch bessere Bilder belegt wurde, als es mit dem hier verwendeten wasserlöslichen Einbettungsmedium möglich ist. Zweck der vorliegenden Mitteilung ist lediglich die Absicherung der früheren Ergebnisse, die offenbar also nicht nur weitgehend unabhängig von der vorgenommenen Fixation (Wohlfarth-Bottermann 1961) sondern auch vom gewählten Einbettungsverfahren reproduziert werden können.

¹⁾ Herrn Dr. M. W. Stäubli und der Firma CIBA AG danken wir für die Überlassung von Versuchsmengen dieses Produktes.

Abb. 1. *Hyalodiscus simplex* (Amöbe der Limax-Gruppe). Osmium-Chrom-Fixierung und „wasserlösliche Einbettung“. Elektronenoptisch 5000 : 1; Endvergrößerung 37.000 : 1. a) Ausschnitt aus dem hyaloplasmatischen Lappen, der vom Plasmalemma (Zellmembran, ZM) begrenzt wird. b) Ausschnitt aus dem Endoplasma mit Mitochondrien (M). Die Pfeile weisen auf die für das Endoplasma charakteristischen Membranstrukturen hin.

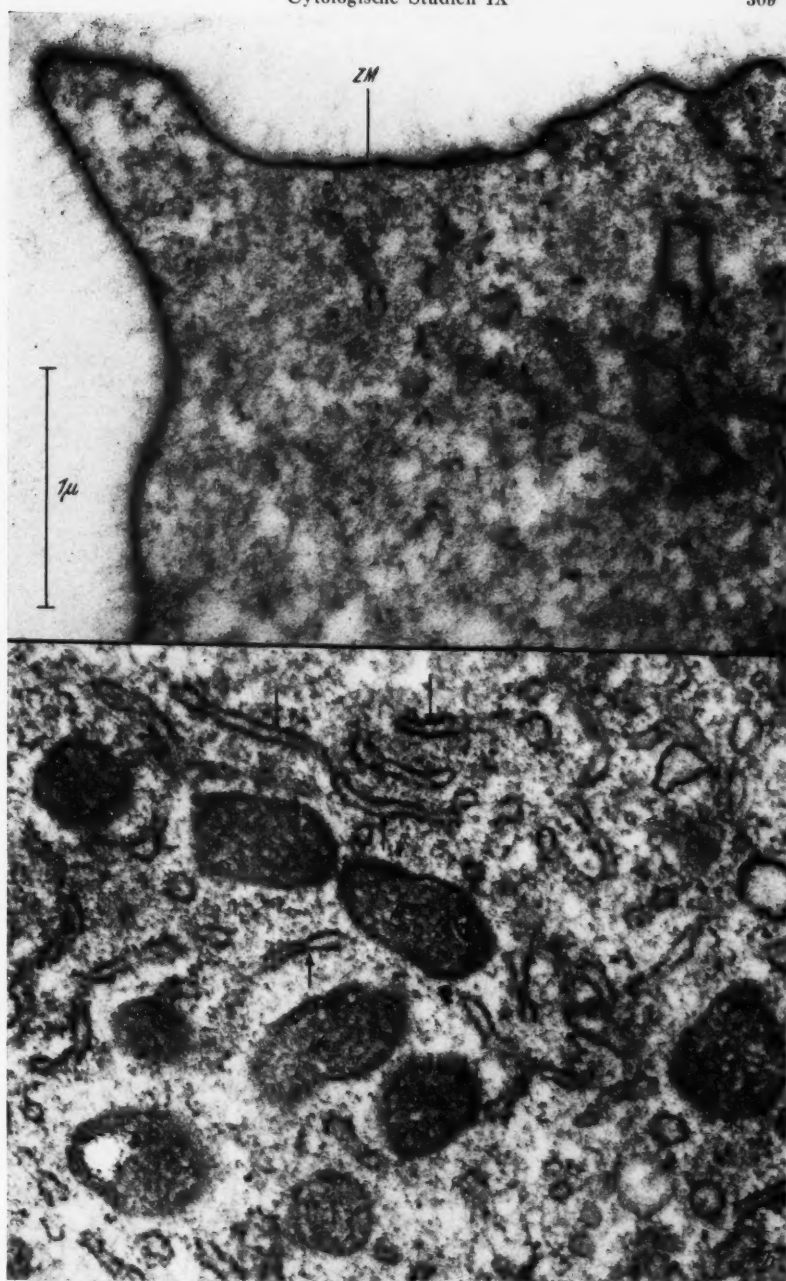


Abb. 1.

20*

Literatur

- Leduc, E. H., und W. Bernhard, 1960 a: New possibilities in ultrastructural cytochemistry. Digestion of nucleic acids in sections for electron microscopy. Proc. IInd Europ. Reg. Conf. on Electron microscopy, 28. 8.—3. 9. 1960, Delft. p. 641—644. Edit. A. L. Houwink und B. J. Split. Publ. by de Nederlandse Vereniging voor Electronenmicroscopie Delft.
- W. Byczkowska-Smyk et W. Bernhard, 1960 b: Essais de cytochimie ultrastructurale. Digestion par la pepsine et la trypsine. C. r. Acad. Sci. (Paris) 250, 4052—4054.
- Schneider, L., und K. E. Wohlfarth-Bottermann, 1959: Protistenstudien IX. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Amöben unter besonderer Berücksichtigung der Feinstruktur des Cytoplasmas. Protoplasma 51, 377—389.
- Stäubli, M. W., 1960: Nouvelle matière d'inclusion hydrosoluble pour la cyto-logie électronique. C. r. Acad. Sci. (Paris) 250, 1137—1139.
- Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1959: Die elektronenmikroskopische Unter-suchung cytoplasmatischer Strukturen. Verh. dtsch. zool. Ges. Münster i. W., Zool. Anz. 1959, Suppl., 393—419.
- 1960: Protistenstudien X. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Amöbe *Hyalodiscus simplex* n. sp., Protoplasma 52, 58—107.
- 1961: Cytologische Studien VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cyto-plasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel. Untersuchungen am Hyaloplasma von Amöben der *Limax*- und *Proteus*-Gruppe. Protoplasma 55, 259—290.

Plastidenstrukturen bei *Passiflora*

Von

Eberhard Schnepf

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. Mai 1961)

Vor kurzem erschien in dieser Zeitschrift eine Mitteilung von Sitte (1961) über einen kristallinen Körper in Wurzelproplastiden von *Pisum sativum*. Er wurde mit dem „Plastidenzentrum“ identifiziert. Rossner (1960) bezeichnete eine ähnliche Struktur in den Plastiden der Sproßregion von *Sinapis alba* als „Primärgranum“. Menke (1960) beschrieb „Heitz-Leyonsche Kristalle“ in den Plastiden der squamulae intravaginales von *Elodea canadensis*.

Beobachtungen an den Plastiden der extrafloralen Nektarien von *Passiflora coerulea* ermöglichen eine Beantwortung einiger in diesen Untersuchungen aufgetretenen Fragen.

Sitte fand in den Wurzelmeristemzellen Ansammlungen stark osmophiler, globulärer Teilchen von knapp 60 Å Durchmesser, gelegentlich in kristalliner Anordnung. Rossner Granula mit einem Durchmesser von 80 bis 100 Å in ähnlicher Ordnung.

In den Drüsenzellen der Nektarien von *Passiflora* und im angrenzenden Gewebe treten in den Plastiden „Kristalle“ auf, die diesen Gebilden (besonders der Erbse) dem Bau, Kontrast und der Größe der Partikel nach in hohem Maße ähnlich sind (Abb. 1, 2, 3 und 6). Der einzige wesentliche Unterschied ist, daß bei *Passiflora*-Kristallen die Netzebenen meistens leicht gebogen sind. Häufig treten die Netzebenen paarweise auf. Die „Elementar-einheiten“ sind in seltenen Fällen (Abb. 5) auch ungeordnet. Es dürfte sich bei all diesen Befunden wohl um grundsätzlich Gleiches handeln.

Die Kristalle von *Passiflora* finden sich in jungen und alten Drüsen, in nichtgrünen (Drüsenzellen) und grünen (angrenzende Zellen) Plastiden, mitunter gemeinsam mit einem „echten“ Prolamellarkörper (= Plastidenzentrum = Primärgranum) (Abb. 6). Im Gegensatz zu diesem haben die Kristalle mit der Lamellenentstehung nichts zu tun, dürfen also nicht mit diesen Termini bezeichnet werden. Über ihre Natur läßt sich nichts Sicheres aussagen. Auch Sitte stellte die verschiedene Größe der Gitterelemente bei „Kristallen“ und „Plastidenzentren“ fest.

Der „echte“ Prolamellarkörper bei *Passiflora* besteht wahrscheinlich aus Bläschen oder sehr unregelmäßigen Röhrchen (Abb. 5, 6 und 7). Er scheint wie in den Blattanlagen und im Vegetationskegel von *Elodea* gebaut zu sein (vgl. Menke). In den squamulae intravaginales dieser Pflanze treten dicht gepackte, gerade oder leicht wellige Tubuli auf, die Röhrenpakete wurden von Menke als „Heitz-Leyonsche Kristalle“ bezeichnet. Die von Heitz (1954) und Leyon (1954) beschriebenen Gebilde sind echte Prolamellarkörper mit besonders hoher Ordnung.

In den verschiedenen Plastiden der *Passiflora*-Nektarien kommen tubuläre Elemente sehr häufig vor (Abb. 4, 5 und 6), meist dicht aneinander gelagert, zum Teil in hexagonal dichtester Packung. Die Röhren entspringen offenbar der inneren Plastidenmembran (Abb. 5, Pfeil) und sind in der Regel durch eine Doppellamelle, mit der sie wahrscheinlich ebenfalls fusionieren, von den übrigen Bezirken der Plastide getrennt. Zu dem Prolamellarkörper und den eigentlichen Plastidenlamellen haben sie keine unmittelbare Beziehung. Der Durchmesser der Tubuli ist recht variabel.

Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die Tubuli von *Passiflora* und von *Elodea* die gleichen Strukturen, die sich nur durch ihre Abgrenzung gegen das Stroma unterscheiden. Es scheint mir daher fraglich, ob es sich bei *Elodea* wirklich um echte „Heitz-Leyon-Kristalle“, also Prolamellarkörper handelt. Vielmehr deutet das Auftreten solcher Gebilde in Drüsenplastiden (vgl. auch die Tubuli in *Drosophyllum*-Drüsen, Schnepf 1960) auf funktionsbedingte Struktureigentümlichkeiten.

Zur Methode: Fixierung mit OsO_4 - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung, Kontrastierung mit Uranylacetat, Einbettung in Vestopal (Schnepf 1960). Aufnahmen: Siemens Elmiskop II.

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Sitte für die Überlassung der Korrekturbögen seiner Arbeit und einiger Aufnahmen sowie seine Hinweise, ferner der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung.

Literatur

- Heitz, E., 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exper. Cell Res. 7, 606–608.
Leyon, H., 1954: The structure of chloroplasts, VI: The origin of the chloroplast laminae. Exper. Cell Res. 7, 609–611.

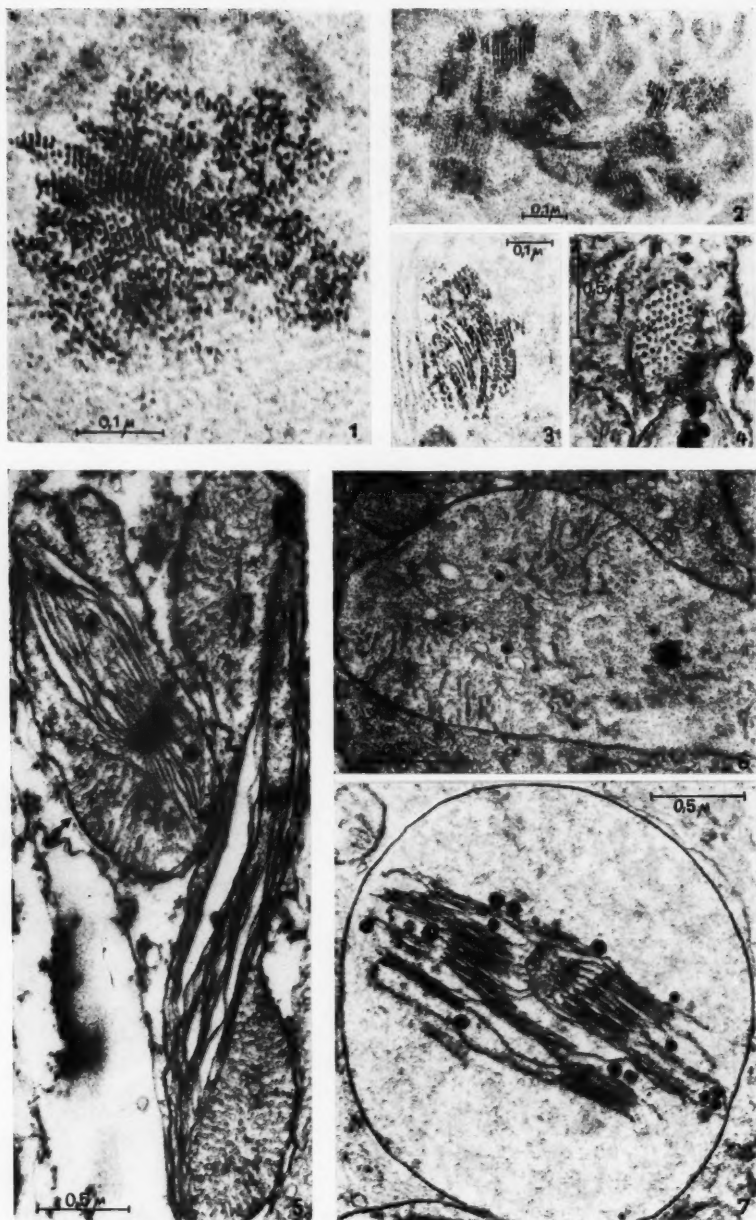


Abb. 1—7. Plastiden der extrafloralen Nektarien von *Passiflora coerulea*.

- Menke, W., 1960: Einige Beobachtungen zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden von *Elodea canadensis*. Z. Naturforsch. 15 b, 800—804.
- Rossner, W., 1960: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluß von Streptomycin auf *Sinapis alba* L. Protoplasma 52, 590—610.
- Schnepf, E., 1960: Zur Feinstruktur der Drüsen von *Drosophyllum lusitanicum*. Planta 54, 641—674.
- Sitte, P., 1961: Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden. Protoplasma 53, 438—442.

Abb. 1. Kristalliner Einschlufkörper eines Chloroplasten aus einer Zelle unter den Drüsenzellen, 140.000 : 1.

Abb. 2 und 3. Kristalline Einschlufkörper aus Plastiden der Drüsenzellen, 75.000 : 1.

Abb. 4. Plastide einer Drüsenzelle mit Tubuli im Querschnitt, 30.000 : 1.

Abb. 5. Zwei Plastiden aus einer Drüsenzelle mit Lamellen, Tubuli, einem Prolamellarkörper (linke Plastide) und osmiophilen „Elementareinheiten“ in unregelmäßiger Lage im oberen Teil beider Plastiden, Pfeilmarkierung: Verbindung der Tubuli mit der inneren Plastidenmembran, 30.000 : 1.

Abb. 6. Plastide aus einer Drüsenzelle mit kristallinem Einschlufkörper (rechts) und Prolamellarkörper (Mitte) sowie Vesikeln und Tubuli, 30.000 : 1.

Abb. 7. Junger Chloroplast aus einer Zelle unter den Drüsenzellen mit Prolamellarkörper, 30.000 : 1.

Referate

Bacq, Z. M., und P. Alexander: Grundlagen der Strahlenbiologie.

(Fundamentals of Radiobiology). Deutsche Übersetzung, herausgegeben von H.-J. Maurer. Mit 115 Abbildungen in 173 Einzeldarstellungen. XII, 396 S. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1958. Ganzleinen DM 49,50.

Die Autoren haben in einer überaus anschaulichen und präzisen Darstellungsweise alles bisher Bekannte und die sich daraus ergebenden Probleme der Strahlenbiologie zusammengefaßt. Besonders in heutiger Zeit, in der dieser junge Zweig der Wissenschaften immer mehr an Bedeutung gewinnt — denken wir nur an die außerordentlich vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Strahlentherapie — muß ein solches Buch für Strahlenbiologen, Ärzte und auch Studenten von großem Nutzen sein.

Das 17. Kapitel umfassende Buch bringt als Einführung alles Wesentliche über die verschiedenen Strahlenqualitäten, Wechselwirkungen zwischen Strahlen und Materie, Dosimetrie, Ionisationsdichte und Ionenreaktionen. Nach einer ausführlichen Besprechung der möglichen direkten und indirekten Strahlenwirkung (wobei besonderes Gewicht auf das Für und Wider der Treffertheorie gelegt wurde) befaßt sich ein Kapitel mit der Strahlenchemie des Wassers und der wäßrigen Lösungen, die ja für biologisches Material von besonderer Bedeutung ist. Davon ausgehend, daß der primäre Prozeß der Bestrahlung wahrscheinlich die Reaktion mit wichtigen Makromolekülen ist, wo die Modifikation eines einzelnen Atomes die Inaktivierung eines Gefüges, das Hunderttausende von Atomen enthält, ergeben kann, werden zunächst die recht gut bekannten Strahlenwirkungen auf synthetische Makromoleküle besprochen, bevor die Proteine, Enzyme und Nucleinsäuren behandelt werden.

Bei den morphologischen Veränderungen in bestrahlten Zellen wird das Hauptgewicht auf die genetischen Phänomene gelegt, weil die durch ionisierende Strahlen hervorgerufenen, sichtbaren Veränderungen bisher am besten an den Chromosomen untersucht und bekannt sind. Trotzdem wäre es sicher wünschenswert, wenn bei einer eventuellen Neuauflage noch etwas näher auf die Strahlenreaktionen des Cytoplasmas und der Mitochondrien eingegangen würde, die lichtmikroskopisch doch auch schon vielfältig untersucht worden sind und seit etwa 1956 auch sehr interessante Aufschlüsse nach elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethoden ergeben haben. Die Bezeichnung „Mikrosome unterschiedlicher Größe“ als sublichtmikroskopische Strukturen der lebenden Zelle kann heute wohl nicht mehr aufrecht erhalten werden, da es sich bei diesen in jedem Fall um „Zelltrümmer“ verschiedener sublichtmikroskopischer Zellstrukturen handelt, die sich nach Zellhomogenisierung auf Grund etwa gleichen Gewichts und gleicher Größe in einer bestimmten Fraktion des Ultrazentrifugats finden.

Weitere Kapitel befassen sich mit den radiomimetischen Substanzen (chemische Substanzen, die biologisch ähnlich wirken wie ionisierende Strahlen), mit der Sauerstoffwirkung in der Strahlenbiologie, der pathologischen Biochemie bestrahlter, lebender Organismen und den Wiederherstellungsvorgängen nach einer Bestrahlung.

Von besonderem Interesse für den Kliniker und praktischen Arzt dürften diejenigen Abhandlungen über die Strahlenkrankheit sein, die die Bedeutung von Hypophyse und Nebennierenrinde, die pathologische Physiologie der Strahlenkrankheit und ihre Behandlung sowie die allgemeine Strahlengefährdung der Bevölkerung erörtern. Kapitel über die chemische Schutzwirkung (Schutzsubstanzen) gegen Röntgen- und Gammastrahlen und deren mögliche Wirkungsmechanismen, die teilweise Abdeckung mit Bleischirmen als physikalische Schutzmaßnahmen und die Wirkung von Injektionen homogenisierter Milz oder homogenisierten Knochenmarks vervollständigen das Buch. Alles wesentliche ist mit übersichtlichen und eindrucksvollen

vollen Tabellen, Diagrammen und Bildern belegt und erläutert. Für den interessierten Leser weisen zahlreiche Literaturangaben auf spezielle Probleme und Fragen hin, so daß das Buch seinen Zweck, Grundlagen der Strahlenbiologie zu übermitteln, in vollem Umfange gerecht wird. Eine besondere Anerkennung gebührt auch den Übersetzern, die es verstanden haben, den englischen Originaltext in einer gut lesbaren und verständlichen Form ins Deutsche zu übertragen. So ist das Buch in seiner Gesamtheit eine ausgezeichnete Leistung, und man kann ihm eine weite Verbreitung wünschen.

L. Schneider (Bonn).

Bonner, J. T.: The Cellular Slime Molds. VIII, 150 S. Princeton, N. J.: Princeton University Press. 1959. \$ 4.—

Bei zunehmender Bedeutung der zellulären Schleimpilze (besonders *Dictyostelium discoideum*) für entwicklungsmechanische Fragestellungen ist es zu begrüßen, daß von berufener Seite das bisherige Wissen — das freilich noch relativ gering ist — und vor allem die experimentellen Möglichkeiten dieses Objekts in anregender Form zusammengestellt worden sind. Nach einer Abgrenzung der zellulären und nicht-zellulären Schleimpilze beschreibt der Verfasser eingehend die Biologie u. a. der *Dictyostelium*-Arten. Diese Grundlage ist notwendig zum Verständnis der Kapitel, die sich mit der experimentellen Analyse der Bewegungsvorgänge im Rahmen der Morphogenese und Differenzierung (während der Bildung von Plasmodien und Fruchtkörpern) befassen. Die Bedeutung chemischer Faktoren für die Steuerung von Zellbewegungen während der Entwicklung eines gestaltlich differenzierten Organismus wird durch die Ergebnisse über das auf die Amöben der *Acrasiales* chemotaktisch wirkende „Acrasin“ und seine Wirkung in ephemeren Gradienten während der Zellaggregation evident. Das Buch stellt gleichermaßen eine Einführung für den allgemein interessierten Biologen als auch ein Nachschlagewerk für den experimentell arbeitenden Embryologen dar.

K. E. Wohlfarth-Bottermann (Bonn).

Corliss, J. O.: The Ciliated Protozoa: Characterisation, Classification and Guide to the Literature. With figures, XIV, 310 p. (International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. Division: Zoology. Vol. 7.) Oxford-London-New York-Paris. Pergamon Press. 1961. 80 s.

Das Hauptanliegen dieses Buches ist eine Revision der Systematik der Ciliophoren, eine Aufgabe, die um so dringender geworden war, als nach den grundlegenden Klassifizierungsarbeiten des 19. Jahrhunderts (und der klassischen, monographischen Bearbeitung dieses Stoffes durch Kahl vor über 25 Jahren) niemand in der notwendigen Breite sammelnd, ordnend und klärend sich hiermit beschäftigt hat. Die Notwendigkeit einer Änderung des bisherigen systematischen Grundgerüsts ergibt sich zweifelsohne daraus, daß in der Zwischenzeit zahlreiche Arten neu beschrieben, entscheidend wichtige Techniken (z. B. Silberimprägnation und Elektronenmikroskopie) eingeführt und damit wesentlich neue Gesichtspunkte zutage gefördert worden sind, die das alte System seit einiger Zeit unbefriedigend erscheinen ließen. Im Rahmen dieser Besprechung braucht weder auf die gut begründete, breite Basis der Revision noch auf die wesentlichen Veränderungen eingegangen zu werden. Für den mit Ciliaten arbeitenden Biologen, der die Systematik nur als Hilfsmittel benötigt, genügt es zu wissen, daß er im vorliegenden Buch in einem ersten Abschnitt die Hauptgruppen der Ciliaten durch ausgezeichnete Abbildungen charakterisiert findet. Überall gestatten mit viel Bedacht ausgewählte Literaturhinweise das Eindringen in ältere und neueste Literatur. In einem besonderen Kapitel

faßt der Autor modernere Erkenntnisse über Evolution und Phylogenie zusammen.

Der 2. Abschnitt des Buches ordnet mit eingehenden, taxonomischen Daten alle Familien und Gattungen in das revidierte System ein, der 3. und letzte Abschnitt bringt eine erstaunlich breite Übersicht über das bisherige Schrifttum, wobei sich der Autor keineswegs auf systematische Arbeiten beschränkt, sondern auch morphologische, physiologische und genetische Literatur im größtmöglichen Umfange berücksichtigt. Es ist selbstverständlich, daß dies nicht vollständig geschehen konnte. Auf 95 Seiten findet man aber im Kleindruck 1700 (!) ausführlich genannte Literaturzitate. Ein das Buch abschließender „systematischer“ Index mit etwa 1400 Namen (ohne Arthezeichnungen) gestattet es dem nachschlagenden Leser, sich schnell und erschöpfend zu informieren.

Auf ein kritisches Urteil über den Wert der systematischen Revision, die der Autor vorlegt, muß in dieser Besprechung (mangels Zuständigkeit) verzichtet werden. Protozoologen, Parasitologen und Zellbiologen dürften das klar gegliederte und offensichtlich mit einem außergewöhnlichen Ausmaß an Arbeit zustandegekommene Werk allein schon deshalb begrüßen und mit Erfolg benutzen, weil es als wesentlichster Beitrag der vergangenen Jahrzehnte mit Sicherheit auf die systematische Einordnung der Ciliophoren klärend wirkt und dem mit Ciliaten arbeitenden Zellforscher ein unentbehrliches Nachschlagewerk in die Hand gibt.

K. E. Wohlfarth-Bottermann (Bonn).

Cronquist, Arthur: Introductory Botany. Mit zahlreichen Abb., VII, 892 S., New-York: Harper & Brothers, Publishers, 1961.

Bei der ersten Durchsicht dieses stattlichen und hervorragend ausgestatteten Lehrbuches fallen bestechende Vorzüge angenehm auf. Klarer Druck und weitgehende Unterteilung des Textes erleichtern die Übersicht. Bei der überaus reichlichen Bebilderung wird anstatt von Mikrophotographien in reichlichem Maße von Zeichnungen Gebrauch gemacht, didaktisch unbedingt ein Vorteil. Jedem der 38 Kapitel ist ein ganzseitiges Photo als Leitbild vorangestellt, bei dessen Auswahl nicht immer nur didaktische, sondern auch ästhetische Gesichtspunkte maßgebend gewesen sein dürften; über die Notwendigkeit dieser zweifellos verteuernenden zusätzlichen Ausstattung mögen die Meinungen geteilt sein. Im Text wird, ein weiterer Vorzug, auch die Geschichte des jeweils behandelten Problems mit den Photos der bahnbrechenden Forscher gebracht.

Bei der Gliederung des Stoffes geht der Verfasser (nach einleitenden Bemerkungen über Botanik als Wissenschaft) von der Zelle aus; auf ganzen 23 Seiten wird der Bau und die Funktion der Zelle inklusive Photosynthese, Atmung, Mineralsalzbedarf, Osmose usw. abgehandelt, wobei, wohl infolge der Knappheit, gelegentlich unpräzise Formulierungen unterlaufen. Abschnitte über Zellteilung (8 S.) und geschlechtliche Fortpflanzung (8 S.) leiten zur Taxonomie und zu den einzelnen Pflanzengruppen über (625 S.). Kapitel über Vererbung, Pflanzengesellschaften, Pflanzengeographie sowie ein Bestimmungsschlüssel der Ordnungen des Pflanzenreiches und ein Verzeichnis von Fachausdrücken beschließen das Werk. Trotz des außerordentlich breiten Raumes, den die Darstellung des Systems einnimmt, ist das Buch doch kein Lehrbuch der systematischen Botanik, sondern vielmehr ein systematisches, fast möchte man sagen eindimensionales Lehrbuch; m. a. W., es wird hier der Versuch gemacht, den gesamten Stoff (einschließlich der Physiologie) in linearer Darstellung vorzutragen. Dies muß aber naturgemäß auf Schwierigkeiten stoßen. So wird die Behandlung der Photosynthese auf die Einleitung und die Kapitel Bakterien und Angiospermen aufgeteilt; die Gärung wird bei den Bakterien, z. T. aber auch bei den

Hefen, die Atmung jedoch schon in der Einleitung und dann wieder bei den Angiospermen besprochen. Ähnlich wird die Anatomie z. B. des Stammes zerrissen; die Telomtheorie findet sich im Kapitel Farne, das sekundäre Dickenwachstum teils bei den Gymnospermen, teils bei den Angiospermen dargestellt, die Gefäßbündel sind teils bei den Farnen, teils bei den Angiospermen abgehandelt. In die Gewebelehre der Angiospermen ist, nicht ganz motiviert, ein Abschnitt über den Boden eingefügt. Solche Beispiele könnten noch vermehrt werden. Auch die Literatur, auf die am Schlusse jedes Kapitels zum Weiterstudium hingewiesen wird, erscheint nach Ansicht des Ref. nicht immer glücklich und repräsentativ ausgewählt.

Es ist für den Ref. zweifellos schwer, einem Lehrbuch, das in erster Linie für den Gebrauch an amerikanischen Hochschulen gedacht ist, gerecht zu werden. Die hier gebotene Einteilung hat aber zweifellos den objektiven Nachteil, innerhalb einer großen, hier gebotenen Stofffülle die natürlichen Zusammenhänge zu zerreißen und damit dem Studierenden das Herausarbeiten des Gemeinsamen und übergeordneter Gesichtspunkte zu erschweren. Aber nur auf solcher Basis kann sich ein gedeihliches Spezialwissen aufbauen und es sollte die vornehmste Aufgabe einer „Introductory Botany“ sein, eine solche Grundlage zu vermitteln. O. Härtel (Graz).

Lindner, A.: Handliche Sammlung mathematisch-statistischer Tafeln. 40 S. Basel-Stuttgart: Birkhäuser Verlag. 1961.

Der Autor, Verfasser zweier bekannter, besonders für den Praktiker bestimmter Monographien über die Anwendung statistischer Methoden, stellt in diesem Büchlein die zu solchen Arbeiten am häufigsten benutzten Tafeln für Verteilungen, Sicherheitspunkte, Transformationen und Zufallszahlen in übersichtlicher Anordnung zusammen. Es ist sehr zu begrüßen, daß diese unentbehrlichen Hilfsmittel zu statistischen Auswertungen in nunmehr handlicher Form zur Verfügung stehen und nicht erst in meist voluminösen Werken nachgeschlagen werden müssen. Entsprechend der Konzeption des Büchleins als eines Arbeitswerkzeuges wird (unter Hinweis auf die betreffende Literatur) auf einen erläuternden Text verzichtet. Bei einer zukünftigen Neuauflage wäre es wünschenswert, noch die Tafeln für den X-Test und den Zeichentest nach van der Waerden aufzunehmen, da diese wegen ihrer Anwendbarkeit bei kleinem n und Vorliegen einer unbekannten Verteilung speziell für biologische Arbeiten von Interesse sind.

Ed. Stadelmann (Freiburg/Schweiz).

Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung. Begründet von L. V. Heilbrunn und F. Weber. Herausgegeben von M. Alfert, H. Bauer, C. V. Harding, F. Weber. Band II, C8d: Permeabilitätstheorien. Von V. Wartiovaara und R. Collander, Helsinki. Mit 14 Abb., IV, 98 S. Wien: Springer-Verlag. 1960. S 174.—, DM 29.—, sfr. 29.70, \$ 6.90, £ 2/9/6. Subskriptionspreis S 139.20, DM 23.20, sfr. 23.80, \$ 5.50, £ 1/19/6.

Der in Fachkreisen mit Spannung erwartete Beitrag behandelt, in 17 Kapitel und einen Anhang gegliedert, zunächst die Diffusions- und Permeationsvorgänge in leblosen Systemen (Kap. II), dann die Plasmahäute als Ort des Permeationswiderstandes (III) und geht weiter auf die einzelnen Permeabilitätstheorien bzw. Theorien über Teilvorgänge des Permeationsprozesses ein (IV—X, XII—XVI). Dazwischen (XI) liegt ein Abschnitt über die theoretischen Vorstellungen von der Struktur der Plasmahäute. Der letzte, „Rückblick und Ausblick“ betitelte Abschnitt (XVII) skizziert die neueste Fassung der Theorie der Plasmapermeabilität, welche die Autoren auf der Basis der Lipoidfiltertheorie unter Eingliederung wertvoller Elemente verschiedener Permeabilitätstheorien erarbeitet haben.

Als Voraussetzung alles weiteren werden zuerst die Gesetze der Diffusion in homogenen Systemen und die Durchlässigkeitseigenschaften künstlicher, begrenzt durchlässiger Membranen behandelt. Es handelt sich 1. um homogene Membranen aus mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeiten, die nach dem Prinzip der selektiven Löslichkeit, 2. um Porenmembranen, die als Molekülsiebe funktionieren und 3. um die paucimolekularen Membranen, die aus einer oder ganz wenigen Schichten regelmäßig orientierter Moleküle aufgebaut, den Plasmahautschichten am nächsten kommen. Die Modellmembranen der ersten und zweiten Art vermitteln Erkenntnisse über den Vorgang des Hindurchlösens bzw. über die Diffusion durch Poren, letzteres für Anelektrolyte und für Ionen; die dritte Gruppe, die wegen der methodischen Schwierigkeiten bezüglich ihrer Durchlässigkeit am wenigsten erforscht ist, gibt Veranlassung zu einer Überlegung, die im weiteren Verlauf der Darstellung öfter wiederkehrt, daß nämlich die gewohnten, auf weit größere Systeme zugeschnittenen Termini („Hindurchlösen“, „Durchtritt durch Poren“) ebensowenig auf die Verhältnisse in einer paucimolekularen Lipoidschicht übertragen werden können, wie die in vitro gemessenen Verteilungskoeffizienten.

Die Frage, ob der Permeabilitätswiderstand tatsächlich in den Plasmahäuten liegt, leitet zum biologischen Objekt über. Die alte, stets für fundiert gehaltene Annahme, der Permeationswiderstand liege überwiegend in Plasmalemma und Tonoplast, wurde in neuerer Zeit mehrfach angezweifelt. Eine Gruppe von Forschern nimmt an, das Plasmalemma sei besonders für Ionen durchlässiger als die innere Plasmagrenzschicht, der „free space“ erstreckte sich also auch auf das Binnenplasma. Dagegen machen die Autoren geltend, daß großer Widerstand der Plasmahäute gegen den Durchtritt von Ionen durch Versuche mit Isotopen bewiesen wurde. Höfler dagegen nimmt an, daß als lösende Schicht für eindringende lipoidlösliche Substanzen nicht nur die Plasmahäute wirken, sondern auch die Lipoide des Binnenplasmas, so daß ein ununterbrochener Lipoidweg Plasmalemma-Binnenplasma-Tonoplast besteht. Die Verfasser wenden dagegen ein, daß der Kernpunkt des Permeabilitätsproblems nicht in der Erklärung der Durchlässigkeit, sondern der Un- und Schwerdurchlässigkeit der Protoplasten für viele Substanzen liege und daß die Lipoide nicht so sehr als Permeationsweg denn als Isoliermittel zu betrachten seien, welches den Stoffaustausch beschränkt. Höfler hat seither präzisiert, daß das Plasmalemma nur als Schranke für die lipoidunlöslichen, auf den Wasserweg angewiesenen Stoffe aufgefaßt werden soll und daß es den Durchgang lipoidlöslicher Stoffe nicht behindere. Die Verfasser weisen übrigens auch auf die leichte Wegsamkeit des Binnenplasmas für verschiedene Substanzen hin, welche durch Plasmalemma und Tonoplast nicht merklich durchtreten, sich aber in mikrurgischen Versuchen injiziert, im Binnenplasma rasch verteilen. Während also die Lipoide des Plasmalemma für hydrophile Stoffe eine Schranke darstellen, beeinträchtigt der (unzweifelhaft vielfach vorhandene) Lipoidgehalt des Binnenplasmas seine Wegsamkeit für diese Stoffe nicht.

Anschließend werden die einzelnen Permeabilitätstheorien, jede in einem eigenen Kapitel, kritisch referiert; manches davon wird Bestandteil der neuen Theorie oder ist ihr gleichsinnig. Hier kann nur Einzelnes davon berührt werden. Aus dem Abschnitt über die Lipoidtheorie seien die Ausführungen über das Lösungsvermögen der Plasmahautlipoide hervorgehoben: Die Untersuchungen Collanders und seiner Mitarbeiter ergaben bekanntlich, daß zwischen den Permeationskonstanten der lebenden Protoplasten und dem Verteilungskoeffizienten k der verwendeten Diosmotika in dem System Olivenöl/Wasser eine weitgehende positive Korrelation besteht. Bei *Chara ceratophylla* besteht direkte Proportionalität zu k , bei *Nitellopsis obtusa* und *Nitella mucronata* Proportionalität zu $k^{1.15}$ bzw. $k^{1.32}$ (k = Verteilungskoeffizient Olivenöl/Wasser). Demnach stimmt das Lösungs-

mittel Olivenöl bezüglich seiner Hydrophobie wenigstens in großen Zügen mit den osmotisch maßgebenden Bestandteilen der Plasmahaut überein. Am Schluß des Beitrages sind in einem Anhang die Gesetze der Verteilung von Substanzen zwischen organischen Lösungsmitteln und Wasser behandelt. Als ihre vorwiegenden Ursachen werden Polarität (Hydrophilie, Hydrophobie) und Azidität (Basizität) von Lösungsmitteln und gelöstem Stoff charakterisiert. Weiter werden die Eigenschaften der Modellsubstanzen Äther, Olivenöl und weiterer Modellsubstanzen der Literatur im einzelnen besprochen. Wenn man nicht Overtons Permeabilitätsregeln mitzählen will, handelt es sich um die erste Darstellung dieses Gebietes, welche ganz auf die Bedürfnisse des Zellphysiologen ausgerichtet ist; sie stellt einen wichtigen Behelf für künftige Untersuchungen dar.

Bezüglich der Ultrafiltertheorie ist zunächst auf die Sonderstellung des extrem durchlässigen Objektes *Beggiatoa mirabilis* als des unerreichten Schulbeispiels dieser Theorie verwiesen, dem nur noch *Oscillatoria* nahekommt, bei der die Lipoidlöslichkeit der permeierenden Stoffe jedoch bereits eine deutliche Rolle spielt. Für die Mehrzahl der Objekte des Pflanzen- und Tierreiches dominiert dagegen der auffällige Einfluß des Hydrophilie-Hydrophobie-Gegensatzes, neben dem die Molekülgröße nur in geringerem Maße zur Geltung kommt. Die Deutung dieses Einflusses der Molekülgröße hat die Lipoidfiltertheorie Collanders übernommen. Sie ging bekanntlich von der Beobachtung aus, daß die Verbindungen mit Molekulargewicht < 50 bis 60 (mehrfach die ersten Glieder homologer Reihen) wesentlich rascher permeieren als sich aus ihrer Lipoidlöslichkeit ergibt. Später wurde auch der weniger auffällige Einfluß der Molekülgröße größerer Moleküle auf die Permeationsgeschwindigkeit quantitativ erfaßt (inverse Proportionalität zur 1,5ten Potenz des Molekulargewichtes). Es wurde angenommen, daß die Plasmahaut gleichzeitig als ein auswählendes Lösungsmittel und als Ultrafilter wirkt, daß also zwei getrennte Wege für die permeierenden Stoffe vorliegen. Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Plasmahautlipotide und in Ausmaß und Dichte der „Poren“ erschienen geeignet, die empirisch gefundenen Unterschiede zwischen den Permeabilitätsreihen verschiedener Objekte zu deuten. Höfler hat diese Deutung seinem Schema der Permeabilitätstypen zugrunde gelegt; auch in seiner neuesten, nach dem hier besprochenen Heft erschienenen, Veröffentlichung hält er, mit gewissen Abweichungen (siehe oben) an der ursprünglichen Formulierung der Lipoidfiltertheorie fest (Annahme zweier getrennter Wege, Lösungsweg für lipoidlösliche, Wasserweg durch wassergefüllte Poren für die übrigen Substanzen), betrachtet aber die Ultrafilterwirkung nur für die Moleküle unterhalb $M = 60$ für gesichert.

Die Autoren allerdings beenden den Abschnitt über die Lipoidfiltertheorie mit einer Reihe von Argumenten gegen die Vorstellung des Vorkommens von permanenten, wassergefüllten Poren, die von kleinmolekularen Verbindungen „unter Umgehung der Lipoidphase“ benützt werden könnten. (Die Erklärung der nur für scheinbar gehaltenen Ultrafilterfunktion der Plasmahäute wird noch zu referieren sein.) Nach kurzen Abschnitten über die Haftdrucktheorie J. Traubes und die Nathansonsche Mosaiktheorie ist als „Adsorptionstheorie“ die Vorstellung von Schönfelder besprochen, nach der bei der Diffusion gelöster Stoffe durch die Poren von *Beggiatoa* der verfügbare Porenquerschnitt je nach der positiven oder negativen Adsorbierbarkeit des Stoffes an die Porenwandung verschieden groß sein soll. Die Existenz entsprechender Poren bei *Beggiatoa* wird für wahrscheinlich gehalten. Sie müßten nach den entwickelten Vorstellungen mit hydrophober Substanz bekleidet sein. Da Adsorption und Löslichkeit heute als Auswirkungen derselben zwischenmolekularen Kräfte aufgefaßt werden, ist der Unterschied gegenüber der ursprünglichen Lipoidfiltertheorie nicht groß.

Da alle bisher behandelten Theorien Aussagen über das funktionelle Verhalten der Plasmahäute enthalten, ist an dieser Stelle auf die bekannten Vorstellungen über ihren Bau eingegangen (Bungenberg de Jong, Danielli, Frey-Wyssling u. a.). Es ergibt sich, daß jede dieser Theorien geeignet erscheint, sowohl die großen Diffusionswiderstände für stark hydrophile und die große Durchlässigkeit für lipophile Substanzen zu erklären als auch eine Ultrafilterwirkung verständlich zu machen. Von der Permeabilitätsforschung her ist demnach eine Entscheidung für eine dieser Theorien vorerst nicht zu erwarten.

Es folgt die Behandlung einer Reihe weiterer Theorien, die sämtlich neue, fruchtbare Gesichtspunkte in die Diskussion gebracht haben, in ihren letzten Folgerungen aber aus verschiedenen Gründen nicht zu überzeugen vermögen. Die Theorie der aktivierten Permeation (Potentialschwellentheorie) Danielli ist hier erwähnt, welche den hohen Temperaturkoeffizienten der Permeation auf die hohe Aktivierungsenergie zurückführt, die zur Überwindung der in den Grenzschichten liegenden Potentialschwelle nötig ist, ferner der Versuch von Zwolinski und Mitarbeitern, auf Grund des Verhältnisses zwischen Lipoidlöslichkeit und Permeiervermögen zu entscheiden, ob der Permeationswiderstand an der Phasengrenze oder in der Lipidschicht liegt; die für diese Berechnung verfügbaren Daten der Permeabilitätsforschung werden indessen nicht für genau genug gehalten, um das Ergebnis gesichert erscheinen zu lassen. Richtungweisend dürften dagegen die von denselben Autoren berechneten Werte für die freien Energien der Aktivierung und die durch dieselben ermöglichte Schätzung der Entropie der Permeationsprozesse sein. Auch die als „Permeabilitätstheorie Bogen's“ bezeichnete molekularkinetische Analyse des Permeationsvorganges, welche die Wirkung der zwischenmolekularen Kräfte zum Gegenstand hat, ist anschließend gewürdigt, allerdings unter Ablehnung ihrer weiteren theoretischen Folgerungen.

Als einen verhältnismäßig dunklen Abschnitt der Permeabilitätslehre bezeichnen die Verfasser die Theorie der Wasserpermeabilität. Zunächst stellen sie fest, daß das Wasser „durchaus nicht zu den allerhydrophilsten, d. h., zu den am allerwenigsten lipoidlöslichen Verbindungen gehört“, da seine relative Lipoidlöslichkeit etwa der des Äthylenglykol entspreche. Deshalb und in Anbetracht seiner geringen Molekülgröße ist seine Permeationsgeschwindigkeit nicht als enorm hoch aufzufassen und es „besteht somit keine direkte Notwendigkeit, nach einem speziellen Permeationsmechanismus eben für das Wasser zu suchen“. Doch wird anschließend gezeigt, daß für das Wasser Diffusion und Filtration nebeneinander als Durchtrittsmechanismen möglich sind. Auch die Frage der Lokalisation des Permeationswiderstandes ist für das Wasser gesondert zu betrachten: Höfler vor allem nimmt einen wesentlichen Teil des Widerstandes im Binnenplasma an. Für die Vergleichbarkeit mit den Konstanten der Permeation gelöster Stoffe bereitet es große Schwierigkeiten, daß die Permeationsgeschwindigkeit des Wassers als einzige nicht ohne weiteres auf das Konzentrationsgefälle des permeierenden Stoffes bezogen werden kann; besonders Frey-Wyssling und Bochsler haben sich um dieses Problem bemüht. Diffusionsversuche mit isotonenmarkiertem Wasser, bei denen die direkte Abhängigkeit vom Konzentrationsgefälle der permeierenden Substanz gegeben ist, führen wiederum zu Werten, die von den osmotisch bestimmten stark abweichen: eine endgültige Entscheidung über die verschiedenen Erklärungen dieser Differenz dürfte noch nicht möglich sein. — Auch das noch schwierigere Kapitel der Ionenpermeabilität wird berührt.

Das letzte Kapitel bringt die neue Fassung der Permeabilitätstheorie der Autoren. Seine skizzenhaft-knappe Darstellung, welche zu der Überzeugungskraft dieser Ausführungen wesentlich beiträgt, vermag darauf aufzubauen, daß das Für und Wider der bestehenden Theorien vorher

schon abgehandelt wurde. Voraus wird die große Einheitlichkeit der Permeabilitätseigenschaften im Pflanzen- und Tierreich betont; neben ihr treten die zwischen verschiedenen Objekten gefundenen Unterschiede in ihrer Bedeutung zunächst zurück. Das erste große Anliegen ist die abdichtende Wirkung der Plasmagrenzflächen. Die abdichtende Schicht kann nur eine Lipid- oder Lipoproteidschicht sein, da polare Bausteine, wie Proteine, allein in wässriger Umgebung eine derart dichte Packung nicht zu bilden vermögen. Nur eine Lipoidschicht, in der keine starken lateralen Bindungen vorliegen, bleibt unter diesen Verhältnissen dicht und zugleich dehnbar, wie eben die Plasmahaut. Folgende Faktoren werden als entscheidend für die isolierende Wirkung der Grenzschichten bezeichnet: 1. die Dicke der Plasmahaut, 2. die Herabsetzung der Zahl der permeierenden Moleküle in derselben, 3. die Erniedrigung der Wanderungsgeschwindigkeit der Diosmotika in der Grenzschicht. Die Zahl der permeierenden Moleküle in der Grenzschicht (Fall 2) wird erniedrigt: a) durch Herabsetzung des gesamten Querschnitts der Diffusionswege, etwa durch das Vorhandensein großer, undurchdringlicher Strukturelemente wie Proteinmoleküle, b) durch Erniedrigung der Konzentration der permeierenden Substanz infolge der Hydrophobie der Lipide. Die Wanderungsgeschwindigkeit (3) wird durch die hohe Viskosität der Plasmahautlipide herabgesetzt. Die Gesamtwirkung entspricht dem Produkt der Teilwirkungen; daher kann schon eine sehr dünne Lipoidschicht die Diffusion hydrophiler Stoffe stark hemmen.

Die weiteren Ausführungen betreffen den Mechanismus des Durchtrittes. Die Auffassung der Permeation als Diffusion im gelösten Zustand läßt sich nicht mehr wörtlich aufrecht erhalten, weil die Struktur der Lipide in den Plasmahäuten mit der im Innern einer dicken Ölschicht nur begrenzt vergleichbar ist. Gegen die Vorstellung des „Hindurchlösens“ spricht vor allem die schon erwähnte Ultrafilterwirkung der Plasmahaut, der nicht unbedingt eine Ultrafilterstruktur entsprechen muß. Die Lehre von der Diffusion in anisotropen, fest-flüssigen Medien ist noch wenig bearbeitet. Im Falle der Plasmahäute ist außerdem weder die chemische Zusammensetzung noch die physikalische Struktur des Mediums genau bekannt. Dennoch versuchen die Verfasser zu zeigen, wie die scheinbare Ultrafilterwirkung zustande kommen kann; sie bezeichnen sie als scheinbar, weil sie löslichkeitsbedingt ist. Ein Molekül eines der üblichen Diosmotika, zumeist sind es Verbindungen mit einer oder mehreren polaren Gruppen, wird sich im Scheidetrichter in Olivenöl verhältnismäßig leicht, d. h. ohne größere Umordnung der Ölstruktur, zwischen die Ölmoleküle derart einordnen können, daß der erreichte Zustand dem Minimum an freier Energie entspricht. Die Hydratationshülle der übertretenden Moleküle wird gegen eine organische Solvathülle ausgetauscht, die polaren Gruppen des gelösten Moleküls werden in der Nähe des Estersauerstoffes zu liegen kommen, ihre apolaren Teile richten sich nach der quasi-kristallinen Ordnung der Paraffinketten. Auch größere Moleküle mit mehreren polaren Gruppen werden sich dank der verhältnismäßig großen Freiheit der Ölmoleküle einfügen können. Im Falle der Plasmahaut werden sich die kleineren eintretenden Moleküle ebenfalls ohne größere Umgestaltung der Grenzschichtstruktur einpassen. Für die größeren wird eine vollständige Solvation, die der niedrigsten Stufe der freien Energie entspräche, nicht erreichbar sein, was sich in einer Herabsetzung des Verteilungskoeffizienten auswirkt; schon so kann allein durch die Anisotropie der Hautschicht eine Ultrafilterwirkung vorgetäuscht werden. Auch der Raumbedarf der Moleküle beeinflusst die Löslichkeit in der Plasmahaut, wie aus Modellversuchen mit expandierten und komprimierten Oberflächenfilmen zu folgern ist. Am Beispiel des tertiären Butanols wird an Hand schematischer Zeichnungen demonstriert, daß seine Aufnahme mit tiefgreifenden Störungen der Lipoidschicht verbunden sein muß, weil sein Molekül sperrig und wesentlich dicker und kürzer ist als

die Fettsäureketten der Plasmahaut. Der Energieaufwand für seine Aufnahme muß wesentlich größer sein als etwa für die des schmalen, stabförmigen Moleküls des primären Butanols. Weiter wird ausgeführt, daß die Bewegungen der permeierenden Moleküle in der anisotropen Lipidschicht beschränkter und richtungsabhängiger ausfallen müssen als in vitro, wozu noch die Behinderung durch den Raumbedarf der zu seitlicher Verschiebung gezwungenen Lipoidmoleküle kommt. Kleinere Moleküle sind auch diesbezüglich in der anisotropen Schicht weniger behindert. Tatsächlich ist nach Wartiovaara der Temperaturkoeffizient der Permeation für kleinere Moleküle kleiner als für größere. Weiter wird die Möglichkeit diskutiert, daß Moleküle durch die Hautschichten in schrittweisen Drehbewegungen fortschreiten, wobei vor allem auf die schwer deutbaren Verhältnisse der Permeiergeschwindigkeiten des Harnstoffs und seiner Derivate eingegangen wird. Schließlich wird noch auf die Möglichkeit der thermodynamischen Betrachtung der Permeationsvorgänge verwiesen.

Abgesehen von dem wichtigen fachlichen Inhalt empfängt der Leser den stärksten Eindruck von der absoluten Bereitwilligkeit der Autoren, sich von allen Theorien der Vergangenheit zu lösen, wenn es sein müßte, auch von der Lipoidfiltertheorie, um völlig objektiv die Theorie der Permeabilität darzustellen. Die heute geduteten Sachverhalte sind indes immer noch dieselben, welche der Lipoidfiltertheorie seinerzeit zugrunde gelegt wurden: nur treten an die Stelle der mehr sinnbildlichen Erklärungen der Vergangenheit die exakteren physiko-chemischen Vorstellungen der Gegenwart. Mit anderen Worten: die neue Theorie bedeutet nicht die Aufgabe von Collanders Lebenswerk, sondern seine Krönung.

L. Hofmeister (Wien)

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mülkerbastel 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Karl Höfler, Universität Wien, Prof. Dr. E. Perner, Tierärztliche Hochschule, Hannover, und Doz. Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Universität Bonn. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21

Unveränderter Nachdruck 1973

Springer-Verlag Wien · New York

Offsetdruck: Novographic Ing. Wolfgang Schmid, A-1238 Wien

Printed in Austria



L

S

1

